

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos moleculares de regulación de la vía
mTORC1/p70S6K, autofagia y mitofagia:
papel de TSC2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana García Aguilar

DIRECTORES

Manuel Benito de las Heras
Carlos Guillén Viejo

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología molecular II

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN DE LA VÍA mTORC1 /p70S6K, AUTOFAGIA Y MITOFAGIA: PAPEL DE TSC2.

ANA GARCÍA AGUILAR

Bajo la dirección de:

Dr. Manuel Benito de las Heras

Dr. Carlos Guillén Viejo

Madrid, 2016

ÍNDICE



RESUMEN.....	11
ABSTRACT	19
ABREVIATURAS.....	27
ÍNDICE DE TABLAS.....	35
ÍNDICE DE FIGURAS.....	39
1. INTRODUCCION	45
1.1. Diabetes tipo II y papel de la célula β pancreática en la homeostasis metabólica.....	47
1.1.1. La diabetes en la actualidad	47
1.1.2. Etiología y fisiopatología de la diabetes tipo 2	47
1.1.2.1. Resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico	50
1.1.2.2. Restricción calórica y longevidad.....	50
1.1.3. La célula β y su papel en la homeostasis metabólica.....	50
1.1.3.1. Islotes de Langerhans	50
1.1.3.2. Regulación de la secreción de insulina de célula β mediada por glucosa.....	51
1.1.3.3. Plasticidad de la masa de célula β	52
1.1.4. Bases moleculares asociadas al fracaso de la célula β en un contexto de diabetes tipo 2.....	53
1.1.4.1. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.....	53
1.1.4.2. Glucolipotoxicidad.....	53
1.1.4.3. Estrés de retículo endoplásmico (RE) y UPR en célula β	54
1.1.4.4. Deposición de amilina en islotes pancreáticos.....	56
1.2. Señalización celular	57
1.2.1. Ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)	57
1.2.2. La vía AMPK y su papel en la célula β pancreática	58
1.2.3. Complejo de mTORC1.....	59
1.2.3.1. Estructura de los complejos de mTOR: mTORC1 y mTORC2	59
1.2.3.2. Regulación de mTORC1	60
1.2.3.3. Funciones de mTORC1	61
1.2.3.4. Relación de mTORC1 con la enfermedad de cáncer y con el envejecimiento	63
1.2.4. El complejo TSC1-TSC2 como nexo de integración de señales.....	64
1.2.4.1. Complejo de esclerosis tuberosa (TSC)	64
1.2.4.2. Complejo TSC1-TSC2: Estructura proteica, localización y funciones	65
1.2.4.3. Importancia de la vía TSC2/mTORC1 en célula β	67
1.2.4.4. Regulación del complejo TSC1-TSC2 por fosforilación, interacción con otras proteínas y acetilación	68

1.3. Regulación por acetilación/desacetilación de proteínas.....	70
1.3.1. La acetilación y tipos de acetil transferasas en lisinas (KAT).....	70
1.3.2. La desacetilación y tipos de desacetilasas de histonas (HDAC): las sirtuinas	71
1.3.2.1 SIRT1 y metabolismo	75
1.4. El sistema ubiquitin-proteasoma y la autofagia en el control de calidad celular.....	76
1.4.1. El sistema ubiquitin-proteasoma (UPS)	76
1.4.2. Autofagia y mitofagia.....	77
1.4.2.1. Tipos de autofagia y maquinaria autofágica	77
1.4.2.2. Regulación de la autofagia.....	79
1.4.2.3. Papel de la autofagia en la célula β pancreática.....	80
1.4.2.4. Autofagia específica de mitocondrias (mitofagia) y dinámica mitocondrial.....	80
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	83
2.1. Hipótesis y objetivos de la primera parte.....	85
2.2. Hipótesis y objetivos de la segunda parte	85
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
3.1. Cultivos celulares.....	91
3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	91
3.1.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación	91
Condiciones de cultivo	91
Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares	91
Condiciones de experimentación.....	92
Micoplasma y tratamiento de las células contaminadas	92
3.2. Técnicas de ADN recombinante	92
3.2.1. Cultivo de bacterias	92
Transforación de bacterias	92
Cultivo en placas de agar-LB.....	93
Cultivo en LB líquido	93
Congelación en glicerol stock.....	93
3.2.2. Purificación de plásmidos y transformación de bacterias.....	93
3.2.3. Trabajo con enzimas de restricción	94
3.2.4. Producción de partículas retrovirales e infección celular	94
3.2.5. Experimentos de transfección y co-transfección transitoria	95

3.3. Métodos de análisis de expresión génica	95
3.3.1. Extracción de ARN total de las células en cultivo.....	95
3.3.2. Valoración de ácidos nucleicos	95
3.3.3. Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción.....	96
3.3.4. PCR cuantitativa	96
3.4. Análisis de expresión de proteínas	97
3.4.1. Western-Blot.....	97
3.4.2. Inmunoprecipitación	98
3.4.3. Análisis de la estabilidad de la proteína TSC2	98
3.4.4. Aislamiento de mitocondrias para la detección de proteínas oxidadas	99
3.4.5. Métodos de purificación de la proteína TSC2.....	99
Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.....	99
Purificación de TSC2 mediante una columna de cromatografía de afinidad.....	100
3.5. Técnicas de imagen	100
3.5.1. Inmunofluorescencia de células en cultivo.....	100
3.5.2. Microscopia confocal.....	101
3.5.3. Ensayo de Mitotimer	101
3.6. Otras técnicas.....	102
3.6.1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	102
3.6.2. Ensayo de proliferación por cristal violeta	102
3.6.3. Predicción de posibles sitios de acetilación y/o desacetilación en lisinas de TSC2 empleando programas <i>in silico</i>	102
Musite.....	102
PAIL.....	103
Lysacet	105
ASEB	105
3.6.4. Cuantificación.....	105
3.6.5. Análisis estadístico.....	105
3.7. Materiales	106
3.7.1. Listado de anticuerpos primarios	106
3.7.2. Listado de anticuerpos secundarios	107
3.7.3. Reactivos	107
3.7.4. Agentes farmacológicos usados	107
3.7.5. Listado de plásmidos	110

4. RESULTADOS	113
4.1. Modulación de la ruta mTORC1, la proliferación y la autofagia mediada por la regulación del estado de acetilación de la proteína TSC2.....	115
4.1.1. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 modula la vía de mTORC1 y la autofagia.....	115
4.1.2. SIRT1 modula el estado de acetilación en lisinas de TSC2 en su región N-terminal, afectando a la estabilidad de la proteína y regulando la vía mTORC1 y la autofagia	118
4.1.3. Los mutantes de TSC2 (K106Q y K599M) presentan una estabilidad diferente y una regulación diferencial de la ruta de mTORC1 y de la autofagia.....	122
4.1.4. Modulación de la señalización de mTORC1 y la autofagia por modulación de la actividad desacetilasa de SIRT1	125
4.1.5. Los efectos de NAM y RESV sobre la modulación de mTORC1 y la autofagia son dependientes de TSC2	128
4.1.6. La modulación de TSC2/mTORC1 regula la proliferación celular	129
4.1.7. Interacción de TSC2 con otras proteínas.....	131
4.2. Papel de la ruta TSC2/mTORC1/p70S6K en la modulación de la respuesta autofágica y mitofágica inducida por desacoplamiento mitocondrial	132
4.2.1. La hiperactivación de la ruta mTORC1 causada por la eliminación de TSC2 resulta en un impedimento en la respuesta autofágica mediada por un daño oxidativo	132
4.2.2. Las células carentes de TSC2 presentan un aumento en las proteínas mitocondriales oxidadas y envejecidas, debido a un defecto en la activación de la mitofagia	134
4.2.3. Papel de TSC2/mTORC1 en la inducción de mitofagia mediada por CCCP	137
4.2.4. La hiperactivación de mTORC1 causada por delección de TSC2 incrementa la actividad del proteasoma.....	141
5. DISCUSIÓN	145
6. CONCLUSIONES	153
7. BIBLIOGRAFIA.....	159
8. ANEXOS.....	169
8.1. Anexo 1. Variantes patogénicas y no patogénicas de TSC1 y TSC2.....	171
8.2. Anexo 2. Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie.....	183
8.3. Anexo 3. Purificación de V5(TSC2) con columnas de cromatografía de afinidad	184
8.3.1. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células control.....	184
8.3.2. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células tratadas con NAM	199
8.3.3. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células tratadas con RESV	216
8.4. Anexo 4. Predicción de las lisinas de la proteína TSC2 susceptibles de desacetilación por la acción de SIRT1 mediante el uso del programa ASEB.....	230
AGRADECIMIENTOS.....	233
PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS.....	237

RESUMEN



Título de la tesis: Mecanismos moleculares de regulación de la vía mTORC1, proliferación, autofagia, y mitofagia: papel de TSC2.

Introducción:

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) está caracterizada por una primera fase en la cual el evento principal es la alteración en la acción de la insulina, denominado resistencia a la acción de la insulina, con niveles normales de glucemia. Durante esta fase, las células β pancreáticas experimentan un proceso de hiperplasia y de hipertrofia, junto con un aumento en la secreción de insulina para compensar la hiperglucemia (Prentky, M et al. 2006). La duración de dicha fase depende de unos pacientes a otros y, en una etapa final, las células β pancreáticas experimentan un fallo, con la aparición de una hipoinsulinemia manifiesta. Durante la progresión a la DMT2, se ha observado una hiperactivación de la vía del complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1), lo cual es beneficioso en la primera fase debido a que activa la proliferación celular de las células β . Sin embargo, la hiperactivación de mTORC1 de manera crónica contribuye al aumento del estrés de retículo endoplasmático (RE), y al fracaso de la célula β .

Recientemente, nuestro grupo de investigación está centrado en el estudio de la vía de señalización que converge en mTORC1. El complejo de esclerosis tuberosa está formado por las proteínas hamartina (TSC1) y tuberina (TSC2) y funciona como un nexo de integración de señales energéticas y factores de crecimiento. La proteína TSC2 presenta en su estructura un dominio GAP, el cual activa la actividad GTPásica intrínseca de Rheb, promoviendo su inhibición, y como consecuencia, inhibe a mTORC1.

El complejo mTORC1 regula numerosos procesos biológicos, entre los que destacan la proliferación, la síntesis de proteínas y la inhibición de la autofagia. La autofagia es un mecanismo fisiológico de control de calidad citoplasmático, cuya función principal es la eliminación de proteínas u orgánulos dañados, atenuando el efecto del estrés de RE. La importancia de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis de las células β pancreáticas se ha puesto de manifiesto en los últimos años (Jung H.S. et al., 2008; Ebato, C. et al. 2008).

La restricción calórica (CR) modula los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y de las sirtuinas, activando la autofagia, y ha sido relacionado con un aumento en la longevidad en mamíferos (Blagosklonny, 2010). Las sirtuinas son una familia de proteínas histonas desacetilasas dependientes de NAD⁺. En mamíferos, existen siete miembros de sirtuinas (SIRT1-7), de diferente función y sublocalización celular, siendo la sirtuina 1 (SIRT1), la más estudiada de todas ellas. Una de las reacciones más importantes que catalizan las sirtuinas es la desacetilación, que consiste en la eliminación de grupos acetilos de lisinas de proteínas, en presencia de NAD⁺, y formando como productos de la reacción NAM, O-acetil ADP ribosa (OAADPr) y el péptido desacetilado (Jackson, 2003).

Uno de los antecedentes de la tesis fue un trabajo de Ghosh (Ghosh, H.S., 2010) en el que se demostró por primera vez que SIRT1 era capaz de interactuar con la proteína TSC2 en células HeLa, modulando la actividad de la vía de señalización de mTORC1. Asimismo, datos recientes de otros grupos y del nuestro pusieron de manifiesto que la hiperactivación de mTORC1 cau-

sada por una delección de TSC2, conduce a un aumento de proteínas dañadas marcadas para su degradación por autofagia, junto con proteínas de estrés de RE (Bartolomé, A. *et al.* 2012). Por último, hay evidencias que apuntan a que dicha hiperactivación contribuye a un desbalance en la homeostasis mitocondrial, mediada por un impedimento en la activación de la autofagia y en la eliminación específica de mitocondrias dañadas (mitofagia) (Bartolomé, A. *et al.* 2014; Taneike, M., 2016). En estas condiciones, se ha demostrado que la activación de la autofagia, mediante el uso de la rapamicina (clásico inhibidor de mTORC1), tiene efectos beneficiosos y aumenta la supervivencia celular.

Objetivos:

Los objetivos principales de esta tesis son:

- Contribuir al conocimiento de la regulación de la vía mTORC1, y las consecuencias sobre la modulación de la proliferación y la autofagia, mediado por el estado de acetilación de TSC2.
- Profundizar en el papel de la vía TSC2/mTORC1 sobre la regulación del flujo autofágico y mitofágico.

Material y Métodos:

En este trabajo, hemos utilizado líneas de células β (MIN6) y no β pancreáticas (HEK 293T y MEF). Para el análisis del nivel de acetilación de TSC2 se ha realizado inmunoprecipitación de las lisinas acetiladas, y se ha hibridado con el anticuerpo que detecta la proteína TSC2. Para determinar el ciclo y la proliferación celular hemos realizado ensayos de citometría de flujo y cristal violeta. Asimismo, hemos purificado la proteína TSC2 para el análisis por espectrometría de masas de las proteínas asociadas a ella. También, hemos analizado el reciclaje de las proteínas mitocondriales mediante un ensayo de MitoTimer, y hemos estudiado la oxidación de las proteínas mitocondriales mediante la técnica denominada oxyblot. Por último, hemos realizado inmunofluorescencia y microscopia confocal, para el estudio de las interacciones o co-localizaciones entre diferentes proteínas.

En cuanto al material que hemos usado destacan los moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1, el resveratrol (RESV) y la nicotinamida (NAM). También para el análisis de la mitofagia se ha usado el agente desacoplante del potencial de membrana mitocondrial (CCCP). Por último, se usó el inhibidor de la autofagia (cloroquina, CQ) para el estudio del flujo autofágico.

Resultados:

Para abordar el primer objetivo de la tesis hemos sometido a las células a tratamientos con diferentes moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1, y hemos analizado los efectos sobre el estado de acetilación de TSC2, modulación de mTORC1, proliferación y autofagia, en diferentes líneas celulares. Nuestros datos indican que la NAM, el inhibidor alostérico de SIRT1, es capaz de estimular la acetilación en lisinas de TSC2, favoreciendo la activación del complejo mTORC1 y modulando negativamente la autofagia. Por otro lado, el RESV, inductor de la actividad de SIRT1, previene de la acetilación de TSC2, inhibe mTORC1 y favorece la activación de la autofagia.

Asimismo, observamos que los efectos de NAM y RESV sobre la regulación del estado de acetilación de TSC2, la vía de mTORC1 y la autofagia, se vieron abolidos en las células MEF

Sirt1^{-/-} y MIN6 tratadas con un inhibidor de SIRT1 (EX527). Estos datos demostraron que los efectos observados de NAM y RESV eran dependientes de SIRT1.

Con el objetivo de determinar la región de TSC2 modulada por SIRT1, las células HEK 293T fueron co-transfectadas con Flag-SIRT1 y mutantes de TSC2 que contenían diferentes regiones parciales de la proteína N- o C-terminal (cedidos generosamente por el Dr. Mark Nellist). El análisis de los resultados reveló que SIRT1 interacciona por la región N-terminal de TSC2, afectando a su estado de acetilación.

Debido a que nuestros resultados apuntaban a que el estado de acetilación de TSC2 modulaba la ruta mTORC1, nos propusimos analizar el efecto de la acetilación sobre la estabilidad de la proteína. Por un lado, la NAM aumentó la acetilación, así como la ubiquitinación de TSC2, disminuyendo los niveles de la proteína TSC2 y su estabilidad. Por otro lado, el RESV mantuvo el estado de acetilación y disminuyó la ubiquitinación de TSC2, previniendo su degradación. Además, en las células MEF *Sirt1*^{-/-}, encontramos una hiperacetilación de TSC2, así como un incremento en el estado de ubiquitinación de la proteína, y una disminución en los niveles de TSC2.

Para profundizar en el estudio del papel de TSC2 en el control de mTORC1 por NAM y RESV, usamos las células MIN6 *Tsc2-shRNA* y los MEF *Tsc2*^{+/+} y *Tsc2*^{-/-}. En presencia de TSC2, NAM indujo la vía mTORC1 e inhibió la autofagia, mientras que el RESV redujo la ruta mTORC1 y activó la autofagia. En ausencia de TSC2, encontramos una hiperactivación basal de la ruta mTORC1, y una pérdida de los efectos observados con NAM o RESV. Estos datos sugieren que TSC2 es necesario para la modulación de los efectos de NAM y RESV en la señalización de mTORC1 y la autofagia.

También, nos propusimos analizar en detalle el efecto de dos mutaciones puntuales en la proteína TSC2 (K106Q y K599M), encontradas en pacientes con esclerosis tuberosa, sobre la ruta mTORC1, así como sus consecuencias. Por un lado un mutante que se considera acetil mimético (TSC2 K106Q) presenta una hiperactivación basal de mTORC1 así como un aumento en el estado de ubiquitinación de la proteína, cuando lo comparamos con TSC2 WT o TSC2 K599M. Asimismo, el mutante TSC2 K106Q presenta un impedimento en la activación de la autofagia en respuesta a RESV, así como una alteración del flujo autofágico, en comparación con el mutante TSC2 K599M o TSC2 WT. El estado de acetilación de ambos mutantes (TSC2 K106Q y TSC2 K599M) fue significativamente menor que el TSC2 WT, lo que sugiere que ambas lisinas son moduladas por acetilación.

Además, la NAM así como el mutante TSC2 K106Q favorecen la proliferación celular, sin embargo el RESV o el mutante TSC2 K599M bloquean la proliferación. Asimismo, el RESV produce parada del ciclo celular (García-Aguilar, 2016). Por último, la purificación de TSC2 y el análisis por espectrometría de masas, reveló que TSC2 interacciona con numerosas proteínas entre las cuales destacan proteínas involucradas en el ciclo celular, proteínas de replicación y reparación del ADN, helicasas, glicoproteínas, proteínas asociadas a los telómeros y factores de iniciación o de elongación de la traducción.

Para el último objetivo de la tesis, analizamos la respuesta autofágica y mitocondrial frente a un daño oxidativo (estimulación con CCCP) en las células MEF *Tsc2*^{+/+} y *Tsc2*^{-/-}. En primer lugar, observamos que las células deficientes de TSC2 presentan una hiperactivación basal de mTORC1, que no se inhibe en respuesta a un tratamiento con CCCP. En segundo lugar, estas células *Tsc2*^{-/-} presentan un déficit en la activación de la autofagia, y como consecuencia, se produce una acumulación de proteínas y de mitocondrias marcadas con p62. El tratamiento con rapamicina, ejerce un efecto positivo en estas células, disminuyendo la vía de mTORC1, activan-

do la autofagia y disminuyendo los niveles de p62.

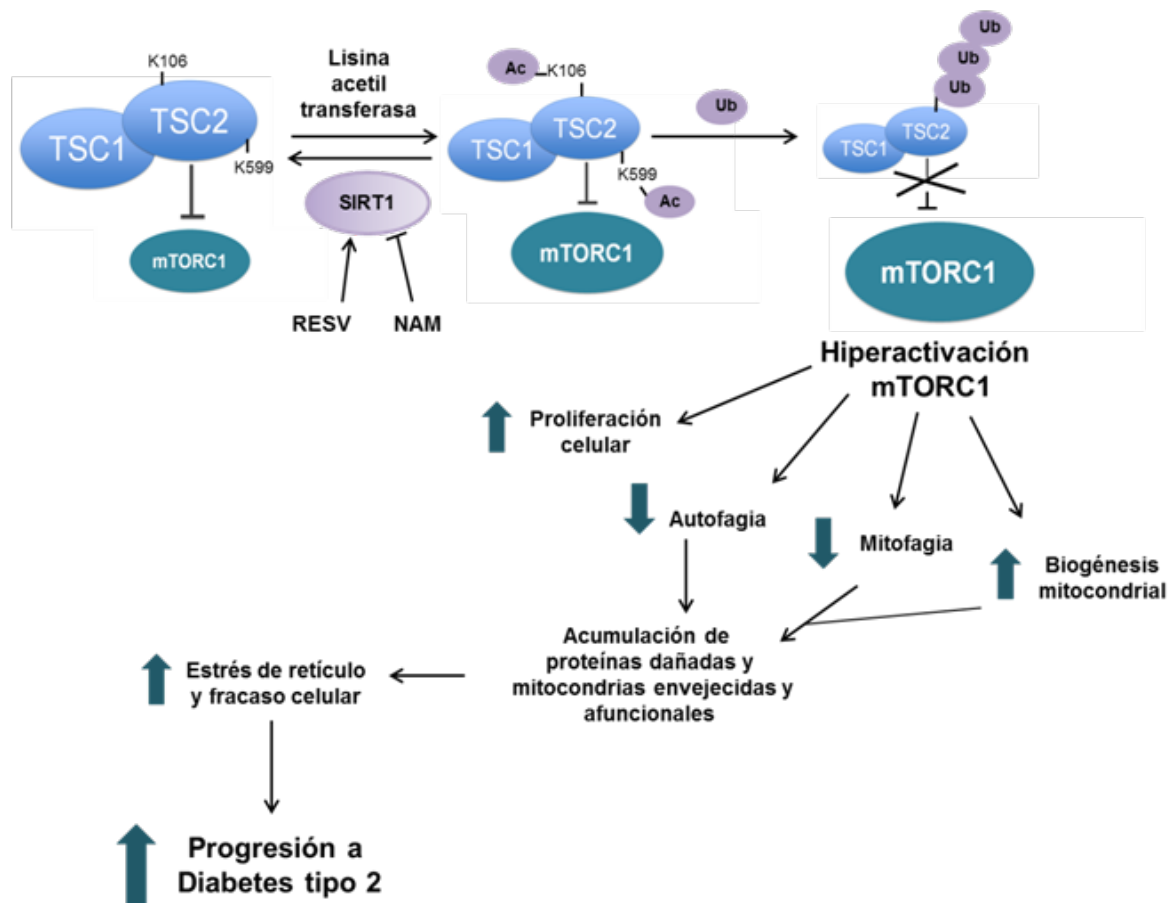
Como era de esperar, las células con hiperactivación basal de mTORC1 causada por una delección de TSC2, tienen aumentada la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, en las células deficientes de TSC2 existe un mayor número de mitocondrias marcadas con p62 basal, y una menor colocalización con LC3, en respuesta a CCCP. Asimismo, las proteínas mitocondriales de las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentan un mayor envejecimiento. Este dato apoya otro obtenido en las células MIN6 *Tsc2-shRNA*, que presentan un incremento en la oxidación y nitración de proteínas mitocondriales, que disminuye con el tratamiento con rapamicina.

Lo siguiente en lo que profundizamos fue en el estudio detallado de la vía PINK1/Parkina, para conocer si existía un defecto en esta vía en las células carentes de TSC2. Los resultados revelaron que en respuesta a CCCP, las células *Tsc2*^{-/-} presentaron un defecto en la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial, así como una menor translocación de Parkina a la mitocondria. Este defecto parece ser a nivel transcripcional, y se resolvió en las células tratadas con rapamicina. Sin embargo, seguíamos sin observar acumulación de la proteína PINK1 en las células *Tsc2*^{-/-} tratadas con rapamicina y CCCP, pero observamos un incremento de la localización de Parkina en la mitocondria. Una de las hipótesis que decidimos corroborar fue que las células *Tsc2*^{-/-} presentaban un incremento en la actividad del proteasoma, para compensar el defecto en la activación de la autofagia, lo que ya había sido sugerido en otro trabajo (Zhang, 2014). Para ello, sometimos a un pretratamiento con un inhibidor de la actividad del proteasoma (MG-132), a las células *Tsc2*^{-/-} (sin y con rapamicina) en respuesta o no, a CCCP. Los datos revelaron un aumento en la estabilidad de la proteína PINK1 en condiciones basales y en respuesta a CCCP, y una mayor translocación de Parkina a la mitocondria en éste último caso (Bartolomé A., In process).

Conclusiones:

Las conclusiones derivadas de esta tesis son las siguientes:

1. La modulación de SIRT1 sobre el estado de acetilación de TSC2, regula la ruta de mTORC1, que se encuentra hiperactivada en diabéticos de tipo 2. Asimismo, dicha modulación es capaz de disminuir la proliferación, y favorecer la activación de la autofagia, la cual presenta un papel protector frente a un estrés celular. Entender los mecanismos subyacentes que controlan la viabilidad de las células β pueden ayudarnos a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y a la generación de nuevos tratamientos farmacológicos y estrategias preventivas. Nuestra esperanza es que futuras terapias dirigidas a la estimulación de los mecanismos de defensa de la célula β ante el estrés, puedan retrasar o detener la progresión a la diabetes.
2. Por otro lado, la hiperactivación de mTORC1 conduce a un defecto en la activación de la autofagia, y de manera específica, de la mitofagia. Este defecto es debido a que mTORC1 regula negativamente la expresión de la proteína PINK1, y como consecuencia, se produce una menor translocación de Parkina a la mitocondria con potencial de membrana desacoplado, para su posterior degradación.



Esquema que refleja el mecanismo de regulación del estado de acetilación de TSC2, por NAM o RESV, regulación de mTORC1 y modulación de la proliferación y autofagia. Además, muestra los efectos observados por la hiperactivación de mTORC1, lo que lleva al fracaso celular.

ABSTRACT



Title: Molecular mechanisms of mTORC1 regulation, proliferation, autophagy and mitophagy: role of TSC2.

Introduction:

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is characterised by a first phase in which the principal event is the defect in the insulin's action, called insulin resistance, accompanied with normoglycemia. During this phase, pancreatic β cells increased its cell number (hyperplasia) and its cell size (hypertrophy), along with an increase in insulin secretion in order to compensate hyperglycemia (Prentky, M *et al.* 2006). The duration of this phase is different in each patient, and finally, β cells begin to fail, and hypoinsulinemia appears. During T2DM progression, it was observed a hyperactivation of the complex 1 of the mammalian target of rapamycin (mTORC1), which is beneficial in the first phase due to an increase in β cell proliferation. However, the chronic mTORC1 hyperactivation drives to an increase in endoplasmic reticulum (ER) stress, and β cell failure.

Recently, our group is focused on the study of mTORC1 pathway. Tuberous sclerosis complex, formed by two proteins called hamartin (TSC1) and tuberlin (TSC2), acts an integrator of energetic signals and growth factors. TSC2 protein presents a GAP domain, which activates Rheb intrinsic GTPase activity, promoting its inhibition, and as a consequence, mTORC1 inhibition.

The mTORC1 signaling regulates numerous biological processes, such as proliferation, protein synthesis and autophagy inhibition. Autophagy is a physiological mechanism of cytoplasmic quality control, which its main function is the elimination of damaged proteins and organelles, diminishing ER-stress. Autophagy plays an important role in the maintaining β cells homeostasis (Jung H.S. *et al.*, 2008; Ebato, C. *et al.* 2008).

Calorie restriction (RC) modulates changes in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and sirtuins levels, activating autophagy, and has been related with mammalian longevity. Sirtuins are histone deacetylases NAD⁺-dependent. In mammals, there are seven members of this family (SIRT1-7), each one has a different function and subcellular localization, being sirtuin1 (SIRT1) the most studied. Deacetylation reaction is one of the most important functions, consisting in removing acetyl groups from protein lysines, yielding nicotinamide and O-acetyl ADP-ribose (OAADPr) along with the deacetylated lysine (Jackson, 2003).

It is described that TSC2 is interacting with SIRT1 in HeLa cells, modulating mTORC1 activity (Ghosh, H.S., 2010). Moreover, data from others and our group demonstrate that mTORC1 hyperactivation caused by TSC2 deletion, drives to an increase in damaged proteins marked to be degraded by autophagy system, along with ER-stress proteins (Bartolomé, 2012). Finally, some evidences pointed to a mitochondrial homeostasis dysbalance in cells with mTORC1 hyperactivation, due to an impediment in autophagic response and the specific elimination of damaged mitochondria (mitophagy) (Bartolomé, A. *et al.* 2014; Taneike, M., 2016). In these conditions, it has been demonstrated that autophagy stimulation, using rapamycin (a classical inhibitor of mTORC1), has beneficial effects in cell survival.

Aims:

The main aims of this thesis are:

- Contribute to the knowledge of mTORC1 regulation, and the consequences in the modulation of proliferation and autophagy, mediated by TSC2 acetylation status.
- Explore the role of TSC2/mTORC1 pathway in the regulation of autophagic and mitophagic flux.

Material and methods:

In this work, we used a pancreatic β cell line (MIN6) and non-pancreatic β cell lines (MEF and HEK). To assess TSC2 acetylation status, anti-pan acetylated lysine was immunoprecipitated, and western blot was probed with anti-TSC2 antibody. To explore cell proliferation, cells were submitted to violet crystal assay or flux cytometry. Moreover, we analyzed the mitochondrial turnover by using MitoTimer assay, and we studied mitochondrial protein oxidation using oxy-blot technique. Finally, we also did immunofluorescence and confocal imaging in order to observe co-localizations, and interacting proteins.

We used different modulators of SIRT1 deacetylase activity, resveratrol (RESV) and nicotinamide (NAM). To investigate mitophagy we used the chemical uncoupler of mitochondrial membrane potential (CCCP). We also used the autophagy inhibitor called cloroquine (CQ), to study the autophagic flux.

Results:

To address the first aim, we submitted cell lines used in this study to different modulators of SIRT1 deacetylase activity, and we analyzed the effects on TSC2 acetylation status, mTORC1 activity, proliferation and autophagy. Our data indicate that NAM, an allosteric inhibitor of SIRT1, was able to stimulate TSC2 lysine acetylation, favoring mTORC1 activation, and inhibiting autophagy. In contrast, RESV, an inducer of SIRT1 activity, prevents TSC2 acetylation, reduces mTORC1 activity and activates autophagy.

Moreover, the effects of NAM or RESV on TSC2 acetylation state and mTORC1 signaling were abolished in *Sirt1*^{-/-} cells and in MIN6 cell line treated with a potent chemical inhibitor of SIRT1 enzymatic activity (EX527). These data demonstrate that the effects observed with NAM and RESV are SIRT1-dependent.

To assure the region of TSC2 that is required for modulation by SIRT1, we co-transfected HEK 293T cells with expression constructs encoding Flag-SIRT1 and different N-terminal or C-terminal partial regions of TSC2 (generously provided by PhD. Mark Nellist). The analysis of the results demonstrates that SIRT1 is interacting with TSC2 by its N-terminal region, affecting TSC2 acetylation status.

Owing to the fact that our data pointed to a regulation of mTORC1 by TSC2 acetylation, the next aim was to analyze the effect of TSC2 acetylation on its stability. On one hand, NAM increased TSC2 acetylation, as well as ubiquitination status, diminishing TSC2 protein levels and reducing its stability. On the other hand, RESV maintains TSC2 acetylation levels, diminishes TSC2 ubiquitination status, preventing it from degradation. Also, we observed an increase in acetylation and ubiquitination TSC2 status, and a reduction in TSC2 protein levels in MEF *Sirt1*^{-/-} cells.

To further study the role of TSC2 in the control of mTORC1 by NAM and RESV, we used *Tsc2-knockdown* MIN6 cells and *Tsc2* +/+ and -/- MEFs. As expected, *Tsc2* knockdown induced basal mTORC1 activation in MIN6, as well as in MEF *Tsc2* -/-. NAM stimulated mTORC1 signaling, and inhibited autophagy in the presence of TSC2, while RESV diminished mTORC1 signaling and increased autophagy. Neither NAM nor RESV affected mTORC1 signaling or autophagy in *Tsc2* -/- MEFs or MIN6 *Tsc2* knock-down cells. These data suggest that TSC2 is necessary for mediating the effects of both NAM and RESV, on mTORC1 signaling and autophagy.

Also, we examine in detail the effect of two isolated mutations in TSC2 protein (K106Q and K599M), presented in patients suffering from tuberous sclerosis, on mTORC1 signaling, and its consequences. On one hand, a mutant that represents an acetyl-mimetic variant, revealed a higher mTORC1 basal activity, as well as a higher ubiquitination, when compared with TSC2 WT or TSC2 K599M. In addition, there was a reduction in autophagy activation in response to RESV, and a blockade in the autophagic flux, in comparison with TSC2 K599M or TSC2 WT. The acetylation status diminished in both TSC2 mutants, indicating that both lysines are really acetylated.

Moreover, NAM and TSC2 K106Q mutant favored cell proliferation, while RESV or TSC2 K599M mutant diminished cell proliferation. Furthermore, RESV blocks cell cycle progression (García-Aguilar, 2016). Finally, TSC2 purification and mass spectrometry analysis revealed that TSC2 is interacting with numerous proteins, including proteins involved in cell cycle, DNA replication and reparation, helicases, glycoproteins, telomere-associated protein, elongation factors and translation initiation factors.

To address the last aim of this thesis, we analyzed the autophagic and mitophagic induction after oxidative phosphorylation uncoupling (CCCP stimulation) in MEF *Tsc2*+/+ and *Tsc2*-/- cells. Firstly, we observed an expected basal mTORC1 hyperactivation, and with no downregulation in mTORC1 signaling in response to CCCP. Secondly, *Tsc2*-/- cells present an impaired autophagic response, and consequently, they showed increased level of p62 linked to proteins and organelles. Rapamycin treatment has a positive effect on these cells, diminishing mTORC1 signaling, activating autophagy and decreasing p62 levels.

As we expected, mTORC1 hyperactivation due to TSC2 deletion, provokes an increase in mitochondrial biogenesis. However, in *Tsc2*-/-cells exists a higher number of mitochondria marked with p62 in basal conditions, and a reduction in LC3 colocalization in response to CCCP. Moreover, MEF *Tsc2*-/-cells showed increased mitochondrial protein aging. These data are consistent with the increase in oxidation and nitration of mitochondrial proteins observed in MIN6 *Tsc2*-shRNA cells, which diminishes with rapamycin treatment.

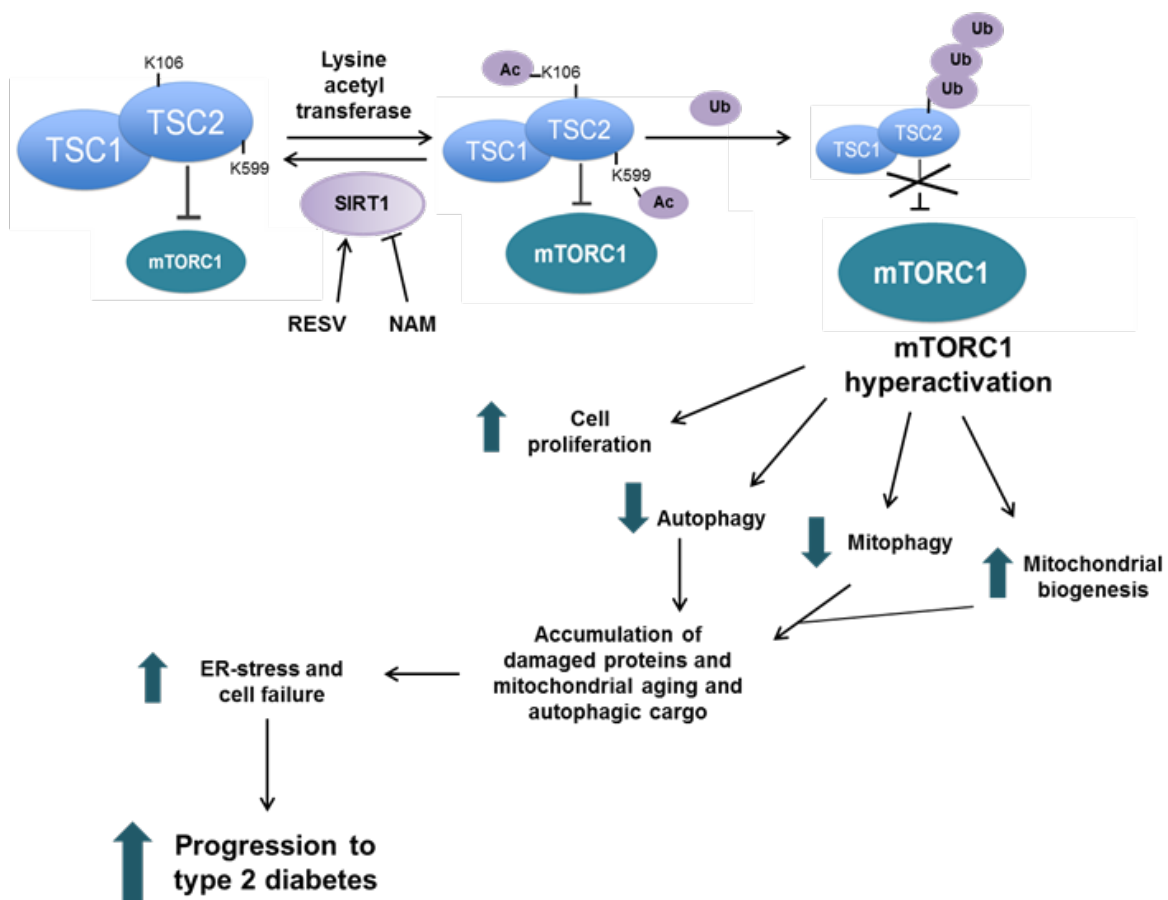
Next, we explore the detailed mechanism of PINK1/Parkin pathway, to determine if there was a defect in this pathway in TSC2 deficient cells. Results revealed that in response to CCCP, MEF *Tsc2*-/-cells presents an impaired accumulation of PINK1 in the mitochondrial membrane, as well as a reduction in Parkin translocation to mitochondria. This defect appears to be at a transcriptional level, and it could be resolved in cells treated with rapamycin. However, we did not observe PINK1 accumulation in TSC2 deficient cells treated with rapamycin and CCCP, but we observe an increase in Parkin recruitment to mitochondria. One of the hypotheses we wanted to corroborate was if these TSC2 deficient cells presented an augmented proteasome activity, in order to compensate autophagy impairment, consistent with previous data (Zhang, 2014). For this purpose, we submitted *Tsc2*-/-cells (control and treated with rapamycin) to a pretreatment with the proteasome inhibitor (MG-132), in response or not to CCCP. The analysis of those

data revealed an increase in PINK1 protein stability in basal and CCCP-treatment conditions, as well as a recovery in Parkin recruitment to mitochondria in response to CCCP.

Conclusions:

The conclusions derived from this thesis are the following:

1. On one hand, the modulation of SIRT1 in TSC2 acetylation status regulates mTORC1 activity, which is hyperactivated in T2DM. Moreover, this positive modulation by SIRT1 is able to diminish cell proliferation, and to activate autophagy, which presents a protective role under stress conditions. Understanding the mechanism controlling β cell viability can help us to identify new therapeutic targets and to generate new pharmacological treatments and preventive strategies. Our hope is that new future targeted therapies could stimulate β cell defense mechanisms and delay the progression of type 2 diabetes.
2. In the other hand, mTORC1 hyperactivation leads to a defect in autophagic response, and specifically, in mitophagic response. This defect is because of mTORC1 negatively regulates PINK1 protein expression, and therefore, it provokes a less translocation of Parkin to the mitochondria with the potential membrane collapsed, for the subsequent degradation.



Scheme depicting the proposed mechanism of regulation of TSC2 acetylation status by NAM or RESV, modulating mTORC1 signaling, cell proliferation and autophagy. Also, it shows the effects observed in mTORC1 hyperactivation, which leads to cell failure

ABREVIATURAS



ACC	Acetil CoA-carboxilasa
Akt/PKB	Proteína quinasa B
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Adenosínmonofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato-3', 5'-cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ARD1	Proteína 1 del dominio del factor de ADP ribosilación
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF4/6	Factor de transcripción activador 4
Atg	Gen relacionado con la autofagia
ATP	Trifosfato de adenosina
BCL-2	Proteína 2 del linfoma de células B
BCL-xL	Forma extra-larga de la proteína del linfoma de células B
BIP/GRP78	Proteína de union a inmunoglobulinas
BSA	Albúmina sérica bovina
CaMKII	Quinasa 2 dependiente de calcio y calmodulina
CCCP	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
CHOP	Proteína con homología C/EBP (Gadd153)
CHX	Cicloheximida
CQ	Cloroquina
DAPI	4'-6'-diamino-2-fenilindol
DEPTOR	Proteína con dominio DEPde interacción conmTOR
DMEM	Medio de Eagle modificado porDulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DRP-1	Proteína relacionada con la dinamina 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EiF2α	Factor de iniciación de la traducción eucariota-2a
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERAD	Complejo de degradación asociado a RE
Fis1	Proteína de fisión 1

FBS	Suero fetal bovino
FKBP	Proteína de unión a FK506/tacrolimus
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GDP	Guanosíndifosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GLP-1	Péptido similar al de glucagón 1
GLUT	Transportador de glucosa
GTP	Guanosíntrifosfato
HADHA	HidroxiacilCoA deshidrogenasa
HDAC	Desacetilasas de histonas
HEK	Células embrionarias de riñón humanas
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
IR	Receptor de insulina
IRS1	Sustrato 1 del receptor de insulina
IRE1α	Enzima con requerimiento de inositol-1
KAT	Lisina acetil-transferasa
LC3B	Proteína de unión a microtúbulos
LKB1	Proteína quinasa B1 del hígado
MIN6	Clon 6 de insulinoma de ratón
mLST8	Objetivo de la rapamicina subunidad complejo LST8
mTORC1/2	Complejo 1 y 2 diana de rapamicina
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MFN1/2	Mitofusina 1/2
NA	Ácido nicotínico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAM	Nicotinamida
Nampt	Nicotinamidafosforribosil-transferasa
NAT	N-acetil transferasa
NES	Secuencia de exportación nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear

NMN	Nicotinamidamononucleótido
Nmnat	Nicotinamidamononucleótido adenil-transferasa
OAADPr	O-acetil ADP ribosa
PARK2	Parkina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa
PERK	Quinasa similar a la quinasa del RE
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PBS	Tampón salino fosfato
PINK1	Quinasa 1 putativa inducida por PTEN
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina
PTM	Modificación postraduccional
PTP1B	Proteína 1B fosfatasa de tirosina
P62/SQSTM1	Proteína de unión a ubiquitina
P70S6K	Quinasa de la S6 de 70 kDa
PGC1α/β	Coactivador 1 α / β del receptor de peroxisoma activado por proliferador
RAPA	Rapamicina
RAPTOR	Proteína reguladora asociada con mTOR
RC	Restricción calórica
RE	Retículo endoplasmático
REDD1	Regulada en el desarrollo y en respuestas a daño en el DNA 1
RESV	Resveratrol
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro
RICTOR	Compañero de mTOR insensible a rapamicina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sir2	Regulador 2 de la información silente
SH2	Homología 2 a la oncoproteína Src
SIRT1	Sirtuina 1
S6	Proteína ribosomal S6
shRNA	Pequeña horquilla de ARN

TOM20	Translocasa de la membrana externa de 20 kDa
TSC1/2	Proteína 1/2 del complejo de esclerosis tuberosa
UCP	Proteína desacoplante mitocondrial
ULK	Quinasa 1 activadora de la autofagia similar a unc-51
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
UPS	Sistema ubiquitin proteasoma
WB	Western-blot
WT	Wild-type (gen o proteína natural)
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1.1. Familias de KAT	71
Tabla 1.2. Distribución subcelular y papel fisiológico de los siete isotipos de sirtuinas	72
Tabla 2.1. Listado de anticuerpos primarios	106
Tabla 2.2. Listado de anticuerpos secundarios	107

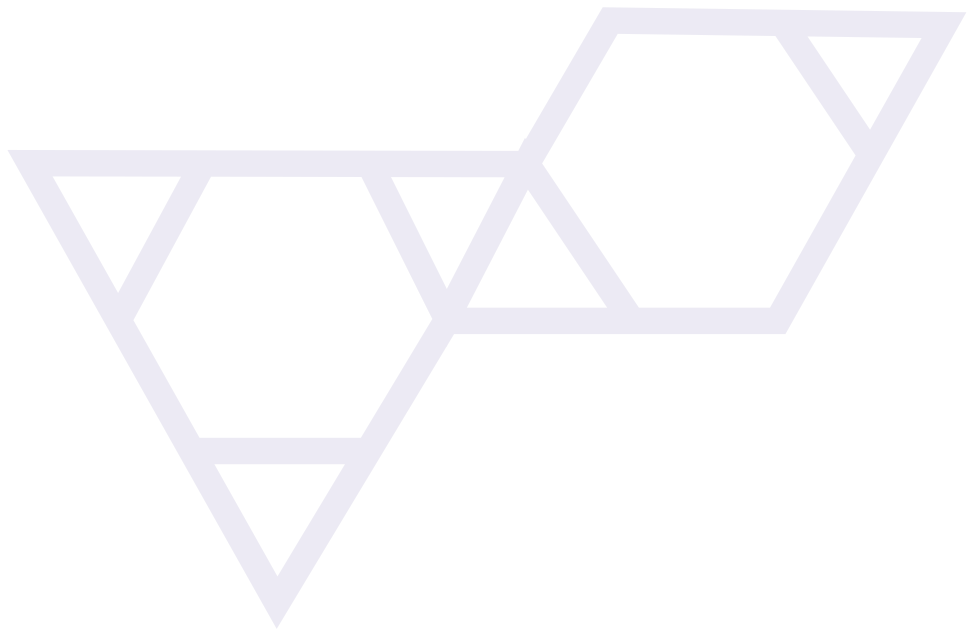
ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1.1. Etapas en el desarrollo de la diabetes tipo 2	48
Figura 1.2. Progresión a la diabetes tipo 2.....	49
Figura 1.3. Citoarquitectura de los islotes pancreáticos y acinos circulantes.....	51
Figura 1.4. Respuesta a proteínas no plegadas (UPR)	55
Figura 1.5. Complejos de mTOR (mTORC1 y mTORC2)	60
Figura 1.6. mTORC1 como integrador de señales energéticas y de factores de crecimiento	61
Figura 1.7. Esquema que representa las redes de señalización que convergen en la vía de 63TSC2/mTORC1	63
Figura 1.8. Estructura y dominios de las proteínas TSC1 y TSC2	65
Figura 1.9. Regulación de mTORC1 mediada por la actividad GAP de TSC2	66
Figura 1.10. Regulación de mTORC1 en respuesta a privación de aminoácidos en la superficie lisosomal	67
Figura 1.11. Regulación del complejo TSC1-TSC2.....	70
Figura 1.12. Esquema de las reacciones típicas catalizadas por las sirtuinas.....	73
Figura 1.13. Principales vías de biosíntesis de NAD ⁺	73
Figura 1.14. Mecanismo de regulación de las sirtuinas por NAM (imagen superior) y mecanismo de desacetilación por NAD ⁺ (imagen inferior)	74
Figura 1.15. Tipos de autofagia	78
Figura 1.16. Sistemas de conjugación de proteínas Atg	79
Figura 3.1. Método de purificación de V5 (TSC2) mediante cromatografía de afinidad en columna	100
Figura 3.2. Predicción de la acetilación en lisinas de TSC2 humana con el programa de MUSITE	103
Figura 3.3. Predicción de la acetilación en lisinas de TSC2 humana con el programa de PAIL.....	104
Figura 4.1. Modulación del estado de acetilación en lisinas de TSC2 y la regulación de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV	116
Figura 4.2. Localización de los diferentes mutantes de SIRT1 (SIRT1-WT-GFP, SIRT1-NLS2-GFP y SIRT1-NES2-GFP)	117
Figura 4.3. Efectos de la NAM y el RESV sobre el estado de acetilación en lisinas de TSC2, la ruta mTORC1, y la autofagia.....	118
Figura 4.4. La modulación del estado de acetilación de TSC2 y la actividad de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV es dependiente de SIRT1.107.....	119
Figura 4.5. SIRT1 desacetila a TSC2 por su región N-terminal	120
Figura 4.6. Menor estabilidad de la proteína TSC2 en las células MEF Sirt1 -/-.....	121
Figura 4.7. La acetilación de TSC2 está correlacionada con una mayor ubiquitinación y degradación de la proteína	122

Figura 4.8. Los mutantes TSC2 K599M y TSC2 K106Q presentan una modulación diferencial de la vía de mTORC1	123
Figura 4.9. Los mutantes de TSC2 (K106Q y K599M) presentan un menor grado de acetilación de TSC2, y el mutante mimético de acetilación (K106Q) muestra un mayor grado de ubiquitinación y menor estabilidad, en comparación con TSC2 WT o TSC2 K599M	124
Figura 4.10. El mutante TSC2 K106Q presenta un bloqueo en la activación de la autofagia en respuesta a RESV	125
Figura 4.11. La nicotinamida estimula, y el resveratrol inhibe la señalización de mTORC1, modulando la autofagia de manera dosis dependiente	126
Figura 4.12. El resveratrol inhibe, y la nicotinamida estimula la señalización de mTORC1, modulando la autofagia a diferentes tiempos	127
Figura 4.13. El RESV activa la vía de AMPK en todas las líneas celulares.....	128
Figura 4.14. Papel esencial de TSC2 sobre la modulación de la vía de mTORC1 y la autofagia en respuesta a NAM y RESV en las células MIN6 y MEF.....	129
Figura 4.15. La NAM estimula, y el RESV bloquea la proliferación celular en las células MIN6 y MEF	130
Figura 4.16. El mutante TSC2 K106Q activa y el TSC2 K599M disminuye la proliferación celular en las células HEK y en las MIN6.....	131
Figura 4.17. Purificación de V5 por el método de cromatografía de afinidad en columna	131
Figura 4.18. Aumento de la biogénesis mitocondrial en las células MEF Tsc2-/-.....	133
Figura 4.19. Defecto en la inducción de la autofagia y mayor acumulación de proteínas mal plegadas en respuesta a CCCP en los MEF TSC2-/- debido a la hiperactivación de mTORC1.....	134
Figura 4.20. Los MEF TSC2-/- presentan un defecto en la inducción de mitofagia tras un daño mitocondrial.....	135
Figura 4.21. Aumento en las mitocondrias marcadas con p62 y en la oxidación y nitración de las proteínas mitocondriales en las células con hiperactivación de mTORC1 debido a una deficiencia en la proteína TSC2 (MEF TSC2-/- y MIN6 TSC2shRNA), que disminuye en respuesta a rapamicina	136
Figura 4.22. Análisis del envejecimiento mitocondrial mediante un ensayo de MitoTimer	137
Figura 4.23. Defecto en la acumulación de PINK1 en la membrana externa mitocondrial tras la pérdida de potencial mitocondrial en respuesta a CCCP, en los MEF TSC2.....	138
Figura 4.24. Impedimento en la translocación de Parkina (PARK2) en las células deficientes de TSC2 en respuesta a CCCP	139
Figura 4.25. Impedimento en la degradación de mitocondrias en los MEFs deficientes de TSC2, tras una estimulación con CCCP.....	140
Figura 4.26. Reacumulación de PINK1 en las células MEF TSC2-/- en las que se ha reintroducido la proteína TSC2	141
Figura 4.27. La expresión de PINK1 es dependiente de la inhibición de mTORC1	142

1 INTRODUCCIÓN



1.1 DIABETES TIPO 2 Y PAPEL DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA EN LA HOMEOSTASIS METABÓLICA

1.1.1 La diabetes en la actualidad

La diabetes mellitus (DM) constituye uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad ya que ha alcanzado proporción epidémica, y actualmente afecta a 415 millones de personas en todo el mundo. De acuerdo con predicciones de la OMS, se prevé que sean 642 millones en 2040, lo cual supondría un aumento de la prevalencia desde el 9,1% en 2015 al 10% en 2040. La mitad de los pacientes con diabetes no están diagnosticados (International Diabetes Federation, 2015).

Las complicaciones causadas por la diabetes son una de las principales causas de muerte en el mundo. La diabetes incrementa el riesgo de enfermedad cardíaca, infarto, y complicaciones microvasculares como ceguera, fallo renal y neuropatía periférica. Aproximadamente 5 millones de personas de edad comprendida entre 20 y 79 han muerto en 2015 a causa de la diabetes, equivalente a una muerte cada 6 segundos.

La diabetes tipo 2 es la forma más común de la diabetes, y ha ido en aumento junto con los nuevos hábitos de vida y cambios socioculturales. La disponibilidad continua de alimentos, muchos de ellos de alta densidad calórica, y el sedentarismo son factores clave para el aumento de prevalencia de obesidad y diabetes. En los países desarrollados, entre un 87-91% de los diabéticos tienen diabetes tipo 2. Además, se estima que aproximadamente un 6,7% de la población mundial tiene intolerancia a la glucosa, y 1 de cada 7 recién nacidos tiene riesgo de haber sufrido diabetes gestacional. Ambas situaciones están asociadas a un mayor factor de riesgo de sufrir diabetes en el futuro.

1.1.2 Etiología y fisiopatología de la diabetes tipo 2

La DM es una enfermedad caracterizada por un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa tanto en ayuno como en estados postabsortivos, y está asociada a numerosas complicaciones, principalmente cardiovasculares, que conducen al desarrollo de patologías si no se recibe el tratamiento adecuado.

La principal diferencia entre diabetes tipo 1 y 2 se encuentra en la etiología. La diabetes tipo 1 se da principalmente en la infancia y es producida por una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que resulta en una deficiencia absoluta de la insulina. Este tipo de diabetes supone entre 5-10% de todos los tipos de diabetes.

Sin embargo, la diabetes tipo 2 (DM 2) es la forma más común de diabetes (90%), de carácter poligénico y se da principalmente en adultos (aunque está habiendo cada vez más casos en niños y adolescentes). La DM 2 se caracteriza por una disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Este fenómeno se conoce con el nombre de resistencia a insulina.

Además de la diabetes tipo 1 y tipo 2, y la diabetes gestacional, existen otros tipos de diabetes menos frecuentes, que incluyen la diabetes monogénica (1-2% de las diabetes), como por ejemplo la diabetes tipo MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*), y la diabetes neonatal. Por último, también están las diabetes secundarias, que aparecen como consecuencia de una complicación de otras enfermedades, principalmente del páncreas o por alteraciones hormonales (síndrome de *Cushing* y acromegalia).

Aunque se desconocen las causas exactas del desarrollo de DM 2, hay numerosos factores de riesgo que están asociados a esta enfermedad, los más importantes son la obesidad, inactividad física, factores genéticos, y el envejecimiento.

Estudios epidemiológicos indican que la diabetes tipo 2 progresa a lo largo de un continuo empeoramiento en la respuesta a insulina, comenzando por una resistencia periférica a la acción de la misma y terminando con la pérdida de secreción por parte de las células β del páncreas (Figura 1.1).

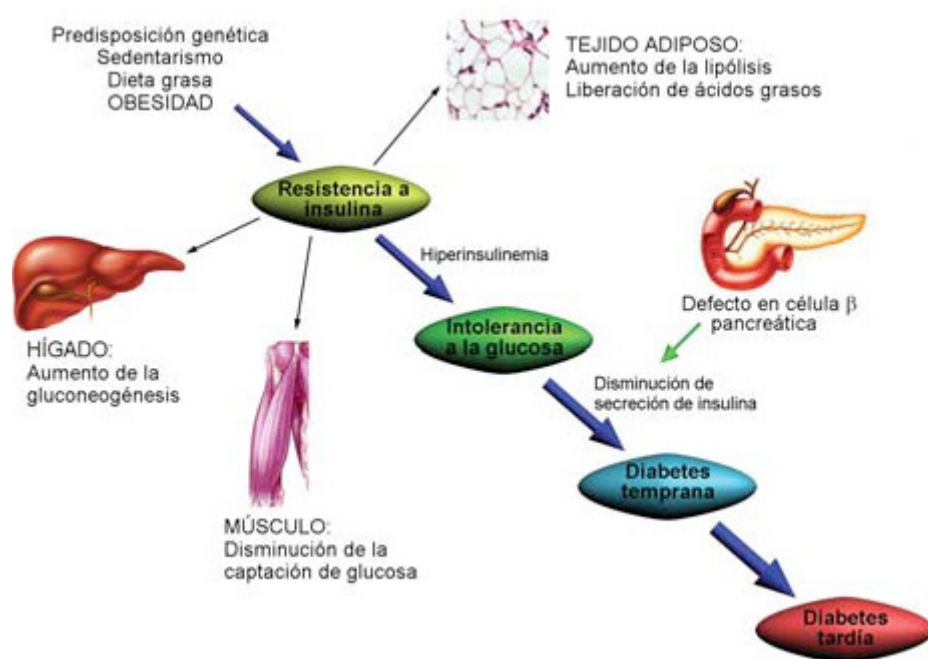


Figura 1.1. Etapas en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Figura del capítulo Resistencia a insulina en el músculo esquelético: ejercicio y activación de receptores nucleares como estrategias terapéuticas. Redes de señalización y estrategias terapéuticas (Real Academia Nacional de Farmacia, 2009).

En concreto, en el músculo esquelético de pacientes que desarrollan resistencia a insulina se ha observado, en los primeros estadios, una reducción en la expresión del transportador de glucosa sensible a insulina, GLUT4, y en la captación de glucosa. Seguidamente, existe una disminución en el metabolismo no oxidativo de la glucosa y en la síntesis de glucógeno (Lizcano, 2002). Al ser el músculo esquelético uno de los tejidos que más consume glucosa en el organismo, una menor captación de glucosa por su parte es uno de los factores que más contribuyen al desarrollo de la hiperglucemia (Stumboll, 2005).

El hígado, tras la ingesta y la producción de insulina por parte de las células β pancreáticas, actúa suprimiendo la producción hepática de glucosa. En situación de resistencia a la insulina en este órgano, la gluconeogénesis hepática estaría aumentada y contribuiría al desarrollo de hiperglucemia (Michael, 2000).

Asimismo, la aparición en el tejido adiposo de resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina provoca un incremento en la lipólisis y la liberación de ácidos grasos, que merman la capacidad de la hormona para reprimir la producción de glucosa en el hígado, aunque aún se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos.

Las células β pancreáticas son fundamentales en la regulación de la homeostasis metabólica, y en los primeros estadios presentan mecanismos compensatorios como aumento de la masa celular (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) para suplir la alta demanda de insulina, generando un estado de hiperinsulinemia compensada, lo que contribuye a largo plazo a agravar este desorden metabólico.

El exceso prolongado de insulina circulante hace que las células β no puedan mantener el mecanismo de compensación y fallan a la hora de responder apropiadamente a la glucosa, lo cual desemboca en el desarrollo de intolerancia a la glucosa y la aparición de una diabetes manifiesta (Figura 1.2).

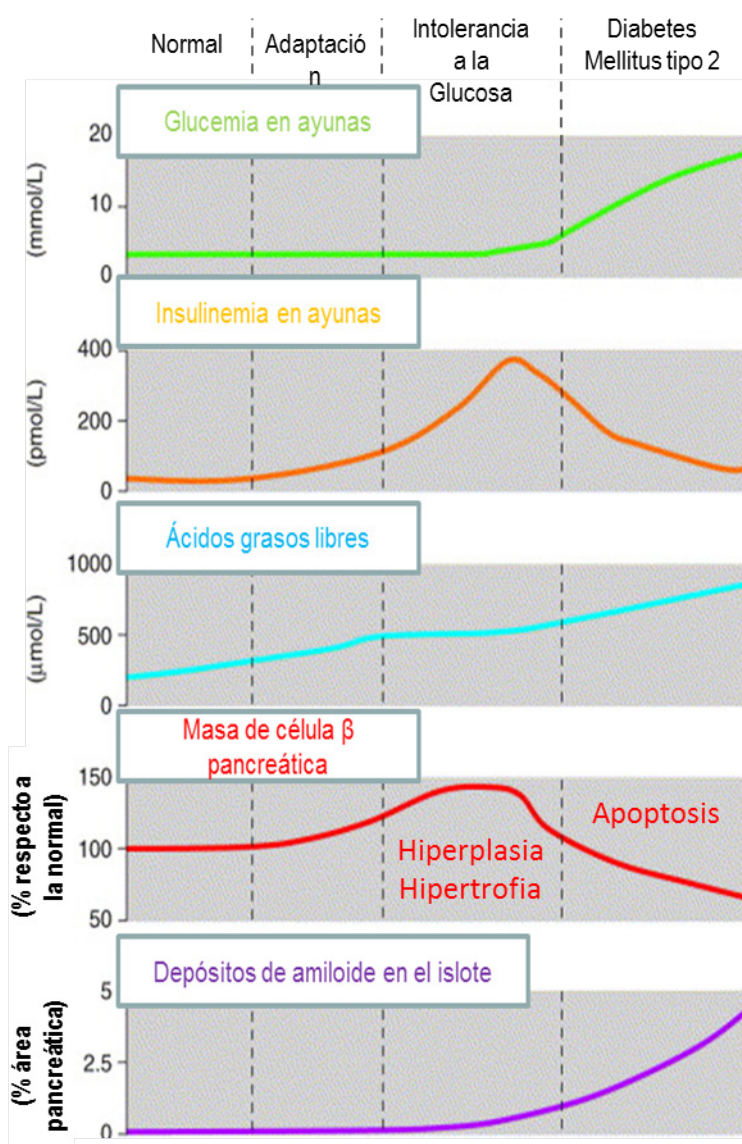


Figura 1.2. Progresión a la diabetes tipo 2. Se representan los niveles de glicemia en ayunas, insulinemia en ayunas, ácidos grasos libres, masa de célula β pancreática y depósitos de amiloide en cada una de las fases de la progresión a la diabetes tipo 2. El punto de inflexión lo representa el fracaso de la célula β , lo que conlleva una disminución de la insulina circulante y la manifestación de la diabetes. Figura adaptada de Lingohr et al, 2002.

1.1.2.1 Resistencia a la insulina y síndrome metabólico

La falta de respuesta a la acción de la insulina y la hiperinsulinemia, incluso en ausencia de diabetes, conducen a una gran variedad de anormalidades, incluyendo un aumento de triglicéridos, una disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad, un aumento de secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, desórdenes en la coagulación, aumento de la resistencia vascular, cambios en los niveles de hormonas tiroideas, atenuación del flujo de sangre periférico y ganancia de peso. Por todo ello, la resistencia a la insulina se asocia con el síndrome metabólico (SM) caracterizado por obesidad abdominal, hipertensión, dislipidemia (altos niveles sanguíneos de triglicéridos y LDL, y bajos de HDL) y estados pro-trombóticos y pro-inflamatorios (Matyus, 2010). Una dieta rica en carbohidratos y lípidos, junto con la falta de actividad física son las causas principales que llevan al desarrollo de SM.

1.1.2.2 Restricción calórica y longevidad

Se sabe que la esperanza de vida de muchos organismos aumenta al ser sometidos a dietas restringidas en calorías, pero dentro de los parámetros saludables (Masoro, 2005). En 1935, McCay *et al.* Publican el primer trabajo donde someten ratas a una restricción calórica (RC) y observan que se extiende su esperanza media de vida (McCay, 1935). Estudios posteriores en otros organismos (levadura, moscas, gusanos y peces) demostraron que la RC retarda el envejecimiento y atenúa la aparición de algunas enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y enfermedades vasculares (Omodei, 2011).

1.1.3 La célula β y su papel en la homeostasis metabólica

1.1.3.1 Islotes de Langerhans

El páncreas es un órgano peritoneal mixto, que presenta funciones tanto exocrinas (secreta enzimas digestivas) como endocrinas. La masa de células endocrinas del páncreas apenas constituye un 1% del total del órgano, y se agrupa en poblaciones de 1000-3000 células formando los islotes de Langerhans. El tipo celular predominante corresponde a la célula β pancreática (65-85%) responsable de la liberación de insulina, mientras que la célula α (20%) secretora de glucagón, la δ (<10%) secretora de somatostatina, la PP (<5%) secretora de polipéptido pancreático, y la ϵ (<1%) secretora de ghrelina están representadas en una menor proporción (Cabrera, 2005).

En roedores, los islotes tienen una composición muy uniforme y característica, con las células α y δ situadas en la periferia y células β en el núcleo. En humanos no se encuentra esta organización, y además los islotes presentan una gran variabilidad en su composición celular dependiendo de la zona del páncreas donde se encuentren (Figura 1.3).

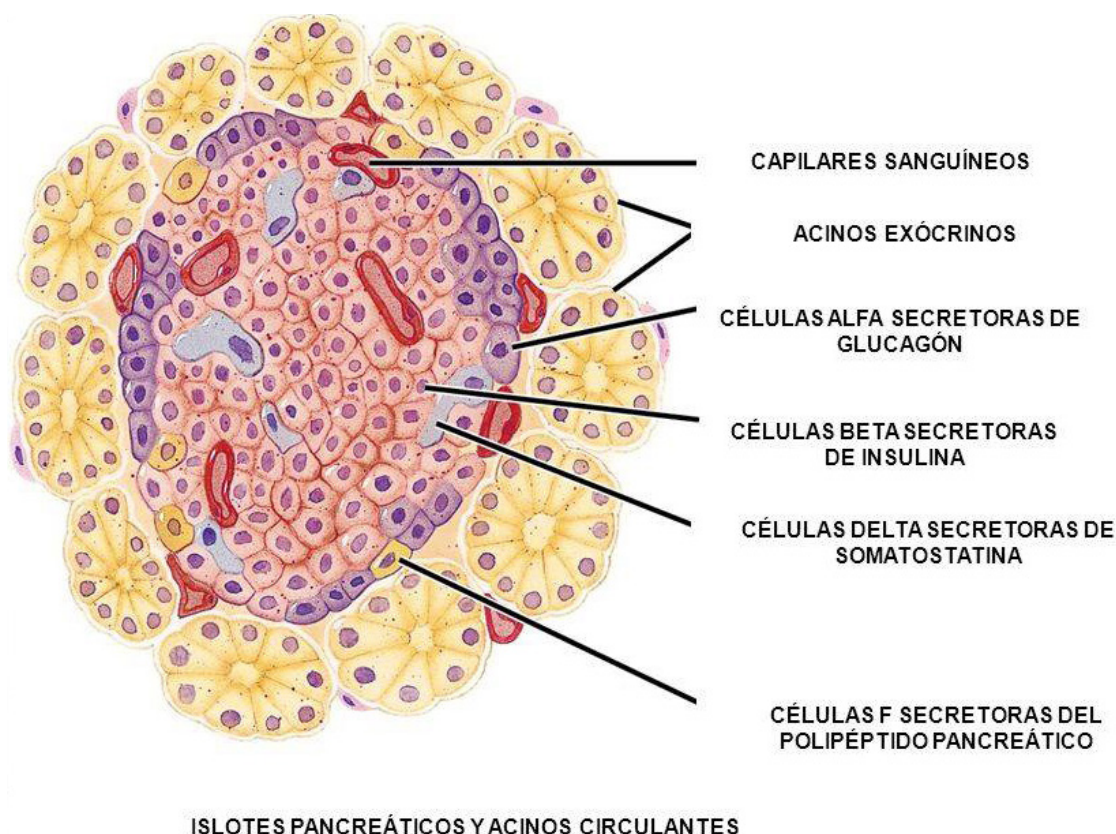


Figure 18-18b Principles of Anatomy and Physiology, 11/e
© 2006 John Wiley & Sons

Figura 1.3. Citoarquitectura de los islotes pancreáticos y acinos circulantes. Imagen tomada de Principios de anatomía y fisiología, John Wiley & Sons, 2006.

1.1.3.2 Regulación de la secreción de insulina de célula β mediada por glucosa.

El control de la glucemia por parte del islote se debe mayoritariamente a la acción directa de las células α y β . Mientras que la célula β libera insulina en concentraciones crecientes de glucosa, la secreción de glucagón por parte de la célula α tiene lugar en condiciones hipoglucémicas. La población δ ejerce una función reguladora indirecta a través de mecanismos paracrinós ya que la somatostatina inhibe la secreción de las células α y β . La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) está regulada positivamente por hormonas gastrointestinales denominadas incretinas (GLP-1, péptido similar al glucagón 1; o el péptido insulínótropo dependiente de glucosa, conocido como GIP o polipéptido inhibitorio gástrico) (Van Citters, 2002). Además, también es modulada por estímulos neuronales simpáticos y parasimpáticos (Holst, y otros, 2004).

Las células β , junto con los hepatocitos, presentan un transporte de glucosa independiente de insulina, gracias al transportador de glucosa 2 (GLUT2). Una vez en el interior, la glucosa se transforma en glucosa 6-fosfato gracias a la acción de una isoforma de la hexoquinasa expresada en célula β e hígado, la hexoquinasa IV (también denominada glucoquinasa). GLUT2 y glucoquinasa forman lo que se conoce en bioquímica médica como gluco-sensor. La glucosa 6-fosfato se metaboliza a piruvato mediante la glicólisis. El piruvato en la célula β es mayoritariamente metabolizado por vía aeróbica, de manera que entra en la mitocondria, activando el ciclo de Krebs que da lugar a la producción de CO_2 y los nucleótidos NADH y FADH₂. Estos últimos

actúan como fuente de transferencia de electrones en la cadena de reacciones que participan en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP.

El incremento en la razón ATP/ADP da lugar al cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (KATP), lo cual lleva a una despolarización de la membrana y apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Esto resulta en un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, desencadenando la secreción de los gránulos de insulina (Figura 4) (Seino, 2011). Aunque la glucosa es el secretagogo por excelencia, otras moléculas también pueden modular el estado energético celular, estimulando la secreción de insulina. Un ejemplo muy estudiado es el caso del metabolismo de aminoácidos (Newsholme, 2007).

1.1.3.3 Plasticidad de la masa de célula β

Respecto al individuo adulto, en los últimos años ha cambiado sustancialmente la concepción científica que tenemos del funcionamiento de la masa de célula β . Se ha pasado de considerarse un órgano estático a uno dinámico y plástico. La plasticidad endocrina se puede definir como la capacidad que tiene este órgano para regular la masa de célula β según las necesidades de insulina y poder así garantizar un óptimo control de la glucemia. Esta plasticidad celular implica tanto una capacidad de expansión como de disminución de la masa de célula β . El páncreas endocrino está en continua remodelación mediante un proceso dinámico, en el cual participan la proliferación celular (hiperplasia), aumento del tamaño celular (hipertrofia), formación de nuevos islotes a partir de precursores ductales (neogénesis) y muerte celular (apoptosis). Tanto hipertrofia como hiperplasia son responsables del aumento de masa de célula β en animales jóvenes, siendo la hipertrofia la principal contribuidora del aumento en adultos (Montanya, 2000).

Existen numerosos factores genéticos, metabólicos y ambientales que afectan este proceso de remodelación. El balance entre los mecanismos que controlan la masa de célula β permite que ésta se adapte a las necesidades metabólicas de diferentes situaciones fisiológicas como el embarazo resultando en aumento del número y volumen de células β debido a una mayor demanda de insulina (Sorenson, 1997), y situaciones patológicas, como la resistencia a la insulina sistémica observada en el modelo doble heterocigoto para el receptor de insulina (IR) e IRS1 (sustrato de receptor a insulina 1) donde se produce un aumento de hasta 15-20 veces la masa de célula β y secreción de insulina (Brüning, 1997). Otros modelos clásicos de aumento compensatorio de masa de célula β incluyen los animales carentes de leptina (ob/ob) (Edvell, y otros, 1997); o de su receptor (db/db) (Chick, y otros, 1970). Ambos son modelos de obesidad por hiperfagia que acaban desarrollando diabetes debido a pérdida de la masa de célula β .

Es importante mencionar a la apoptosis como mecanismo fisiológico para el mantenimiento de la masa de célula β . Como consecuencia de la puesta en marcha de los mecanismos compensatorios en las células β se produce un aumento en los niveles de insulina. La posterior disminución de la demanda de la hormona va acompañada de una reducción en la masa de la célula β . Por lo que de forma fisiológica, siguiendo al aumento de masa de célula β observado durante el embarazo, la masa disminuye por muerte celular programada tras el parto (Scaglia, 1995). De igual manera, la apoptosis de célula β participa de forma fisiológica en el remodelado del islote en neonatos (Scaglia, 1997).

Por lo tanto, la regulación de la homeostasis de la masa de célula β es un proceso complejo y genéticamente heterogéneo.

1.1.4 Bases moleculares asociadas al fracaso de la célula β en un contexto de diabetes tipo 2

El fracaso de la función de la célula β en islotes que están sometidos a una compensación debido a resistencia a la insulina, es un hecho bien documentado. Los mecanismos más probables para el inicio del fracaso incluyen disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, estrés de retículo endoplásmico (RE) y gluco-lipotoxicidad. Una vez se ha desarrollado hiperglucemia, se produce inflamación de islotes, glicosilación de proteínas y deposición de amilina en la célula β , acelerando el proceso de fracaso y muerte por apoptosis de las células (Prentki, 2006).

1.1.4.1 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Un aumento crónico en el metabolismo oxidativo de glucosa y ácidos grasos conduce a un incremento del potencial de membrana mitocondrial y de la producción de superóxidos y especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria. Esta situación genera un estado de estrés oxidativo, y si estos ROS no son detoxificados producen daño a nivel de ADN, lípidos y proteínas, aumento de la oxidación de fosfolípidos mitocondriales, pérdida de potencial mitocondrial, y liberación de citocromo c al citoplasma celular causando apoptosis (Zhao, 2010b). Asimismo, estos ROS inducen la activación de la proteína desacoplante 2 (UCP-2) lo cual disipa el gradiente de protones que permite la síntesis de ATP, disminuyendo la función secretora célula β (Zhang, 2001).

1.1.4.2 Glucolipotoxicidad

Mientras que las elevaciones postprandiales de glucosa y ácidos grasos generan una respuesta secretora aguda en la célula β , en la patología diabética el escenario cambia radicalmente. En estas circunstancias, las concentraciones circulantes de estos nutrientes están anormalmente elevadas de forma crónica, y ello tendría consecuencias sobre la viabilidad de la célula β . Trabajos *in vitro* defienden que la exposición crónica a estos nutrientes causaría apoptosis de la célula β (El-Assaad, 2003). Niveles de glucosa elevados inhiben la vía de la AMPK, con lo que la ACC, enzima limitante en la síntesis lipídica, se encontraría activada, lo que se traduciría en un aumento en los niveles de malonil-CoA, impidiendo el metabolismo oxidativo mitocondrial de los ácidos grasos. En estas condiciones, los mecanismos de detoxificación de dichos ácidos grasos se encuentran disminuidos, generándose lípidos complejos, los cuales son tóxicos. Sin embargo, otros autores defienden que sería un factor de riesgo una vez instaurada la hiperglucemia, y no una causa directa de disfunción de célula β ya que se produciría una compensación, resultando en un aumento en la masa de célula β (Steil, 2001). Varios autores coinciden en que parte del papel deletéreo de la glucosa y los ácidos grasos puede estar causado por un aumento de estrés de RE. Estudios *in vitro* demuestran como concentraciones altas de glucosa de manera crónica aumentan la síntesis de proinsulina por parte del RE en una primera fase. Pero posteriormente se produce estrés de RE y disminución de síntesis de proinsulina (Lipson, 2006).

Asimismo, la hiperglucemia crónica causa numerosas complicaciones en los pacientes diabéticos (Brownlee, 2001). La glucosa activa la vía de las hexosaminas, la cual permite que ésta se combine con los grupos hidroxilo de la serina y/o treonina de las proteínas, proceso que se conoce con el nombre de O-glicosilación. Este proceso comienza en el aparato de Golgi con la unión de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligados por enlace N-glicosídico. Se ha demostrado

que la activación de esta vía se relaciona con un aumento en la transcripción de TGF- β 1 y PAI-1. Además, la hiperglucemia crónica causa aumento en la glicación de proteínas y formación de productos avanzados de glicación (AGE), lo cual genera aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Brownlee, 2001).

1.1.4.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE) y UPR en célula β

El retículo endoplásmico (RE) es el orgánulo responsable de la síntesis y plegamiento adecuado de todas las proteínas antes de ser exportadas al Golgi. Una mayor ingesta calórica exige un mayor esfuerzo a la célula β , que debe incrementar la síntesis y secreción de insulina para mantener la homeostasis metabólica. Cuando esta demanda se convierte en crónica, la capacidad de plegamiento del RE es inferior a la tasa de producción de nuevas proteínas para su secreción (Lipson, 2006), provocando un plegamiento incorrecto de las mismas, generando un ER estrés. Algunos autores consideran que la apoptosis desencadenada por ER estrés crónico en la célula β , es lo que otros han denominado “muerte por agotamiento”.

La respuesta a proteínas no plegadas (UPR) es un proceso fisiológico esencial por el que las células intentan recuperar la homeostasis del RE. La UPR tiene como finalidad aliviar al RE de la sobrecarga de proteínas mal plegadas en el lumen. Para ello, induce una serie de respuestas para disminuir la entrada de proteínas al RE: una menor traducción de ARNm, una mayor degradación de ARNm, y una traducción específica de aquellos ARNm que se encargan del correcto plegamiento (chaperonas, biosíntesis de RE). Además, se pone en marcha el programa de degradación de proteínas mediado por el complejo de degradación asociado a RE (ERAD), del sistema ubiquitin-proteasoma o autofagia. (Merksamer, 2010).

Los tres componentes de la UPR son PERK (quinasa similar a la quinasa del RE), IRE1 α (enzima que requiere inositol 1 α) y ATF6 (factor activador de transcripción 6) cuyas funciones se encuentran resumidas en el siguiente esquema (Figura 5). La presencia de proteínas mal plegadas puede ser reconocida por la proteína regulada por glucosa (GRP78), también denominada BiP (proteína de unión a inmunoglobulinas). Las proteínas mal plegadas compiten con PERK/IRE1 α / ATF6 por su unión a BiP, y cuando esto ocurre, BiP se libera y la señalización de UPR se activa (Ron, 2007) (Figura 1.4).

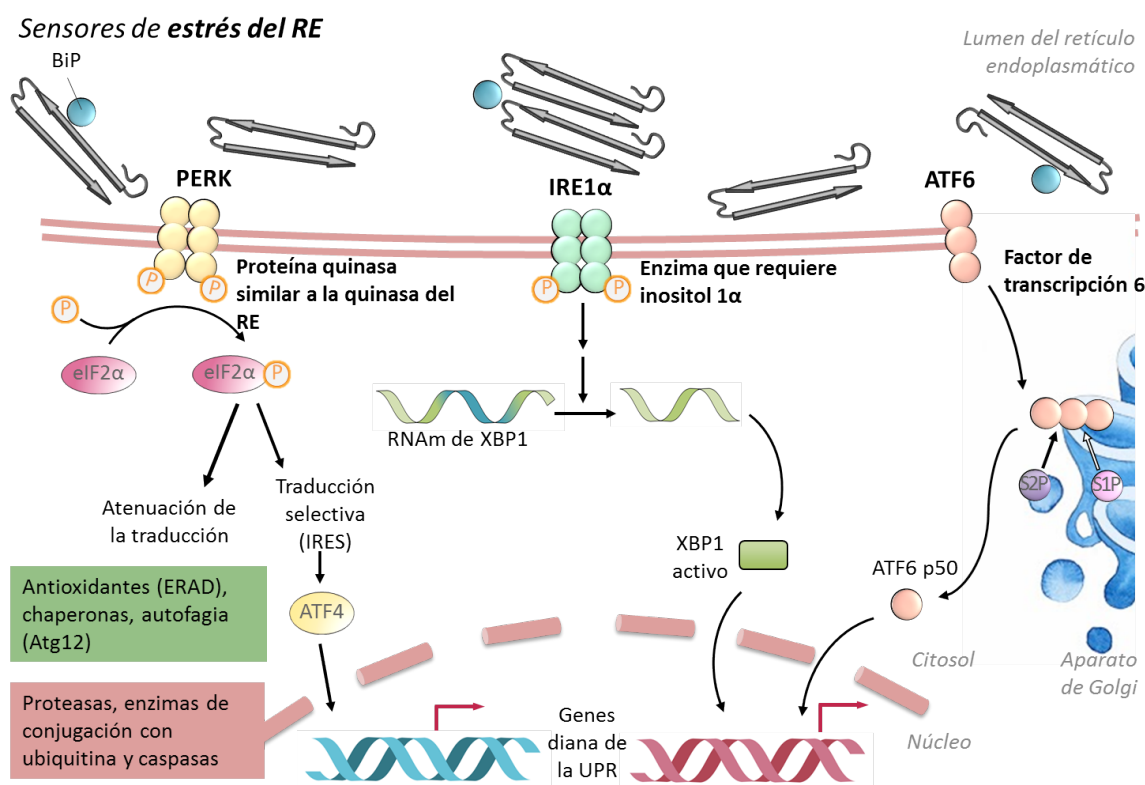


Figura 1.4. Respuesta a proteínas no plegadas (UPR). Principales componentes de la UPR (PERK, IRE1α y ATF), Diseño de Miriam García Hernández, 2014.

La activación de PERK conduce a una represión a corto plazo de nueva síntesis proteica mediada por la fosforilación de eIF2α en la serina 51 (subunidad α del factor 2 eucariota de iniciación a la traducción) (Harding, 2000), y a una inhibición de la biosíntesis de insulina (Harding, 2001b). La activación de la vía de IRE1α promueve el *splicing* (corte y empalme) alternativo del factor de transcripción XBP1 (proteína de unión a caja X), generando XBP1s. XBP1s (activo) va al núcleo y aumenta la síntesis de componentes del sistema ERAD así como de enzimas encargadas del correcto plegamiento de las proteínas (Lee, 2003). La activación de ATF6 conduce a un aumento en la síntesis de genes relacionados con el plegamiento correcto de proteínas, entre los que se encuentra BiP (Adachi, 2008).

La importancia del sistema de UPR en célula β se pone de manifiesto en modelos animales *Perk* ^{-/-}, donde se produce un fenotipo caracterizado por fracaso de la célula β y diabetes (Harding, 2001). Asimismo, la sustitución de la serina 51 por alanina (S51A) de eIF2α, desarrolla obesidad y diabetes cuando es sometido a dieta grasa ya que no es capaz de producir insulina de manera eficiente. Los autores proponen que una inhibición del UPR es vital para la correcta biogénesis de los gránulos de insulina (Scheuner, 2005).

Sin embargo, por otro lado, una excesiva respuesta de UPR puede precipitar la apoptosis de la célula β. Un mecanismo por el cual la UPR presenta respuesta apoptótica es la mediada por ATF4, ATF6 y XBP1S que inducen un aumento de la expresión de nuevos factores de transcripción como es la proteína con homología a C/EBP (CHOP), la cual antagoniza la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y BCL-xL (Oyadomari, 2002). Otro posible mecanismo sería la activación de la vía de las JNK causada por una hiperactivación de IRE1α el cual recluta al factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) (Urano, 2000). Por último, el estrés de RE induce la expresión de caspasa-12 conduciendo a un aumento en la apoptosis (Rao, 2001).

Por último, el estrés de RE está asociado a resistencia a la insulina en hígado, músculo y adiposo. La activación de JNK resulta en una mayor fosforilación en serina de los IRS, contribuyendo a dicha resistencia a la insulina (Ozcan, 2004).

Modelos animales también demuestran como el estrés de RE crónico es uno de los responsables de la muerte de célula β . Es el caso por ejemplo del modelo murino “Akita”, el cual presenta una mutación en un alelo del gen *Ins2* que produce un cambio de cisteína a tirosina (C96Y), inhibiendo la formación de un puente disulfuro crítico (Wang, 1999). Aunque este modelo presenta compensación y producción de insulina, los ratones sufren una pérdida progresiva de células β muy probablemente debido a agregados de insulina presentes en las células β *in vitro* (Oyadomari, 2002).

1.1.4.4 Deposición de amilina en los islotes pancreáticos

La amilina o polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) es una hormona peptídica de 37 aminoácidos co-expresada y co-secretada con la insulina en vesículas de secreción por parte de las células β pancreáticas en respuesta a los mismos estímulos secretagogos de insulina. Existen diferencias entre especies respecto a la formación de estructuras con capacidad de formar agregados o no. Dicha región se sitúa entre los aminoácidos 20 y 29. La amilina con capacidad para formar agregados (capacidad amiloidogénica) aparece en el hombre, en felinos y en primates no humanos. Estas especies comparten una gran homología en la región IAPP20-29, desarrollando de manera espontánea un síndrome similar a la DM2 humana. Los depósitos de IAPP no han sido descritos en roedores como el ratón, la rata, el hámster, el conejo, ni en otras especies de mamíferos, en las cuales no se genera de manera espontánea DM2. La región IAPP20-29 de ratas y ratones es idéntica y no amiloidogénica, debido a la presencia de tres residuos de prolina en la región 20-29 (Westermarck, 2011). La prolina es un aminoácido que afecta a la estabilidad de las estructuras secundarias, impidiendo la agregación.

Este péptido constituye el principal componente de los depósitos de sustancia amiloide que aparecen en los islotes pancreáticos de la inmensa mayoría de individuos que padecieron DM 2. Actualmente, se considera que la presencia de depósitos de sustancia amiloide ejerce un papel crítico en la progresiva disfunción y destrucción de la población celular β que se produce en el curso evolutivo de la DM2 (Jaikaran, 2001). No obstante, los mecanismos moleculares responsables de la conversión de la amilina en oligómeros tóxicos insolubles son, en gran parte, desconocidos. Algunos autores sostienen que dichos depósitos de IAPP inducen estrés de RE en las células β , lo que podría estar favoreciendo la pérdida de funcionalidad y de la viabilidad de la célula β pancreática (Fernandez, 2014). Por otro lado, dado que la amilina es co-secretada con la insulina, como resultado de secuencias promotoras reguladoras comunes para ambos genes, la inducción de resistencia a la insulina ocasiona un incremento en la expresión de la insulina y amilina. En este sentido, el desarrollo de hiperinsulinemia en estados de resistencia a la insulina probablemente va asociado a un incremento de las concentraciones plasmáticas de amilina. Así, se ha hipotetizado que la combinación de la producción de la amilina humana con resistencia a la insulina podría estar implicada en la formación de amiloide *in vivo*, y, al mismo tiempo, puede provocar un deterioro de la secreción de insulina (Höppener, 2000).

1.2 SEÑALIZACIÓN CELULAR

1.2.1 Ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)

La vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) es activada por insulina, factores de crecimiento, citoquinas y otras señales que promueven la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular.

En el caso de la insulina, ésta induce la estimulación de la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina (IR), provocando la autofosforilación del mismo y la fosforilación en los sustratos del receptor de insulina (IRS). Como consecuencia, los IRS 1 o 2 activan a la proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Myers, 1992).

Las PI3K de clase I son un conjunto de enzimas que catalizan la producción de un segundo mensajero lipídico denominado fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Dirigen múltiples respuestas celulares como proliferación, supervivencia y migración (Cita). Están formadas por heterodímeros que constan de una subunidad catalítica con actividad tirosina quinasa p110 (presenta cuatro isoformas: p110 α , β , δ o γ), y una subunidad reguladora, también con múltiples isoformas, p85 α (o sus variantes p55 α y p50 α), p85 β , p55 γ , p101 o p84 (Jean, 2014). La interacción de la subunidad reguladora p85 con el dominio SH2 de los IRSs fosforilados en tirosina aumenta la actividad catalítica de la PI3K. PI3K fosforila al fosfolípido de membrana PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) para formar PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). PIP3 va a reclutar a la membrana plasmática a proteínas de señalización intracelular con dominios de homología a pleckstrina (PH), sirviendo como punto de anclaje (no covalente) y aproximándolas en complejos de señalización que responden a la señal extracelular y transmiten el mensaje al interior intracelular. Dicho dominio está presente en al menos 200 proteínas distintas, desde SOS a proteínas serina/treonina quinasas como las quinasas dependientes de fosfolípidos (PDK1 y PDK2) o la proteína quinasa B (AKT/PKB). Para eliminar estos puntos de anclaje cuando es necesario, existe un grupo de enzimas encargadas de hidrolizar el enlace de fosfato en posición 3 (inositol fosfolípido fosfatasas) del anillo de inositol, entre las cuales destaca PTEN (fosfatasa supresora de tumores de homología a tensina).

Como se ha indicado, PIP3 recluta a PDK1 y a AKT en la membrana celular. Ambas cambian su conformación de tal forma que PDK1 fosforila y activa a AKT (fosforilación en treonina 308). Para la completa activación de AKT es precisa la fosforilación en una serina 473 mediada por mTORC2 (Sarbasov, 2005). Una explicación es que mSIN1 (componente crítico de mTORC2) también posee dominios PH otorgándole la capacidad de poder interactuar con PIP3 en la membrana (Yang, 2006). AKT fosforilado se libera del complejo asociado a la membrana y se dirige al citoplasma donde fosforila a numerosas proteínas relacionadas con el metabolismo, crecimiento celular, regulación de la transcripción y supervivencia celular.

Como ejemplo de funciones metabólicas reguladas por AKT podemos citar, como en el caso de la señalización de la insulina, la activación de la síntesis de glucógeno (fosforilación inactivante de la glucógeno sintasa quinasa 3, GSK3, que de esta forma no puede fosforilar la glucógeno sintasa, GS) y la translocación del transportador de glucosa (GLUT-4) a la membrana para activar el transporte de glucosa a los tejidos extrahepáticos (muscular y adiposo) (Brozinick, 2003). Además, la activación de AKT promueve la fosforilación de FoxO1, factor de transcripción involucrado en la gluconeogénesis. Dicha fosforilación reduce la entrada de FoxO1 al núcleo y la expresión de genes gluconeogénicos, como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Lapante, 2010).

Entre los mecanismos que median el efecto antiapoptótico destacan la inhibición por fosforilación de BAD, que es una proteína de la familia de BCL-2 requerida para activar la apoptosis (Zha, 1996).

1.2.2. La vía AMPK y su papel en la célula β pancreática

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es muy importante en el mantenimiento de la homeostasis energética celular (Hardie, 2004). Se activa cuando existen niveles bajos de ATP, en situaciones de bajos niveles de glucosa, hipoxia, isquemia, o choque térmico. La vía de la AMPK regula positivamente procesos catabólicos como la autofagia o la oxidación de ácidos grasos, para la obtención de ATP.

Estructuralmente, AMPK es un complejo heterotrimérico formado por una subunidad α catalítica, y dos subunidades reguladoras (β y γ). Cada una de ellas presenta dos o tres isoformas codificadas por genes diferentes ($\alpha 1$ o $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$; $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 3$). Aunque algunas isoformas son ubicuas, otras son específicas de corazón, hígado u otros tejidos. La isoforma $\alpha 2$ es la subunidad de la AMPK que predominantemente se encuentra en el músculo esquelético y cardíaco, mientras que, las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ están distribuidas en forma equitativa en la AMPK del hígado. En las células β del páncreas la isoforma $\alpha 1$ es predominante (da Silva Xavier, 2003).

Cuando se incrementa el ratio AMP/ATP, el AMP produce una activación alostérica de AMPK, y permite que LKB1 (proteína quinasa B1 del hígado) fosforile a AMPK en su residuo de treonina 172, aumentando alrededor de 100 veces la actividad de AMPK (Woods, 2003). La CAMKII es una proteína quinasa dependiente de calmodulina, y también está implicada en la activación de la AMPK α en respuesta a altos niveles de calcio intracelular (Hawley, 2005).

AMPK tiene múltiples dianas involucradas en la regulación del metabolismo. Favorece el metabolismo glucídico: 1) Activa la glucólisis (activa a la fosfofructoquinasa 1 y 2), 2) Ejerce una regulación positiva del transporte de glucosa mediante la activación del sustrato de Akt de 160 kDa (AS160), y 3) inhibición de la síntesis de glucógeno (inhibe a glucógeno sintasa). Todo ello favorece un aumento de la sensibilidad a la insulina. AMPK también regula el metabolismo lipídico inhibiendo la síntesis de esteroides (HMGCR, hidroximetilglutaril-CoA reductasa) y lípidos complejos. A su vez, AMPK promueve la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, debido a que inhibe a la acetil CoA-carboxilasa (ACC) (Ruderman, 2013).

Por un lado, AMPK produce parada de ciclo celular (actuando a través de p53 y p27). Además, es un modulador negativo de la proliferación, ya que activa a la proteína TSC2, inhibiendo la ruta mTORC1. Por otro lado, AMPK activa la autofagia y el reciclaje de componentes celulares para favorecer la obtención de ATP, induciendo la activación de proteínas relacionadas con autofagia, como ULK1 (mencionado en detalle más adelante) (Kim, 2011).

Otra característica importante de la AMPK es su interrelación con la proteína 1 de la familia de las sirtuinas (SIRT1) que son desacetilasas NAD⁺ dependientes (ver capítulo sirtuinas). Existen siete miembros de esta familia de proteínas en humanos (SIRT1-SIRT7). La más estudiada es SIRT1 y tiene múltiples dianas, entre las que destaca PGC1 α . Por un lado, AMPK aumenta los niveles de NAD⁺ intracelular, activando a SIRT1, provocando la desacetilación de la proteína PGC1 α . Por otro lado, AMPK fosforila a PGC1 α , el cual en un estado desacetilado y fosforilado alcanza su máxima actividad, promoviendo la biogénesis mitocondrial, e incrementando el gasto energético (Cantó, 2009).

AMPK: papel en la célula β pancreática

AMPK juega un relevante papel en la fisiología de la célula β pancreática, y es considerada como una diana terapéutica prometedora en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La activación prolongada de AMPK por AICAR o metformina inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) (Salt, 1998), debido a una regulación negativa tanto de la expresión de la preproinsulina (Kim, 2008), como de la dinámica de vesículas de secreción (Tsuboi, 2003).

En cuanto al efecto de la AMPK sobre la funcionalidad y la masa de la célula β existe una gran controversia. Algunos autores defienden que la AMPK induce la apoptosis de célula β mediada por la activación de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Kefas, 2003). Sin embargo, este trabajo contrasta con otros que proponen que la activación de la lipólisis mediada por AMPK, y la consiguiente eliminación de ácidos grasos saturados disminuye la apoptosis en célula β (El-Asaad, 2003).

El modelo knock-out de LKB1 de forma específica en célula β muestra una tolerancia aumentada a la glucosa debido a una mayor masa de célula β (hiperplasia e hipertrofia) además de mayor actividad secretora de insulina (Fu, 2009) (Granot, 2009). Estos autores demostraron como la pérdida de LKB1 y la consiguiente menor acción de AMPK en célula β aumenta la actividad de mTORC1 e induce hipertrofia, reversible por tratamiento con rapamicina.

Sorprendentemente el modelo β AMPK-DKO (*Ampka1* -/-; *Ampka2* -/-) no presenta una masa de célula β mayor (Sun, 2010). Un efecto esperable sería una mayor activación de mTORC1 e hipertrofia, sin embargo los autores muestran hipotrofia, sin cambios en la ruta de mTORC1. Es posible que parte de los resultados no esperados con este modelo se deban a la doble delección de AMPK también encontrada en neuronas hipotalámicas, por el uso de Cre bajo el promotor RIP2 (promotor de insulina de rata 2), lo cual al aumentar el tono parasimpático, complica una correcta interpretación de los resultados.

1.2.3. Complejo de mTORC1

1.2.3.1. Estructura de los complejos de mTOR: mTORC1 y mTORC2

La diana de rapamicina de mamífero (mTOR) es una proteína serina/treonina quinasa de 230 kDa, miembro de una subfamilia de proteínas denominadas quinasas relacionadas con la fosfoinositido 3' quinasa (PIKK) (Manning, 2002). mTOR posee un dominio catalítico flanqueado por los dominios FAT (FRAP, ATM, TRRAP) y FATC (FAT C-terminal) cerca de su zona C-terminal (Bossoti, 2000). En este dominio FAT, se localizan los sitios de interacción con el complejo FKBP12-rapamicina (Stan, 1994) y con Rheb. Por otro lado, el extremo N-terminal de mTOR contiene secuencias muy conservadas que corresponden con α -hélices similares a las secuencias de repetición HEAT (encontradas en las proteínas Huntingtina, factor de Elongación 3, subunidad Alfa de la proteína fosfatasa 2A, TOR1), donde se localizan las zonas de interacción con Raptor y Rictor, proteínas que describiremos a continuación.

mTOR es el componente principal de dos complejos multiproteicos mTORC1 y mTORC2. Ambos complejos tienen en común a mLST8 (proteína letal en mamíferos) y DEPTOR (proteína de interacción con mTOR con dominio DEP¹), ésta última es un inhibidor de mTOR.

Ambos complejos tienen una proteína característica esencial para el ensamblaje de todo el complejo y sus interacciones con otras proteínas reguladoras. En el caso de mTORC1 es Raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) (Kim, 2002). Además de mTORC1 contiene otras proteínas reguladoras como es el sustrato de Akt de 40 kDa rico en prolina (PRAS40), cuya activación inhibe a mTOR (Sancak, 2007) (Figura 1.5).

mTORC2 es caracterizado por la presencia de Rictor (acompañante de mTOR insensible a rapamicina) (Sarbasov, 2004), mSIN1 (proteína de mamíferos activada por estrés y de interacción con MAP quinasa), y PROTOR (proteína observada con Rictor) (Figura 1.5).

Una de las características fundamentales que diferencian a los complejos de mTOR es su dispar sensibilidad al compuesto que, paradójicamente, les da nombre; la rapamicina. Mientras que mTORC1 es inhibible por rapamicina, mTORC2 es rapamicina-insensible. Cabe puntualizar que en ciertas líneas celulares se ha observado inhibición de mTORC2 tras tratamiento prolongado con rapamicina (Sarbasov, 2006).

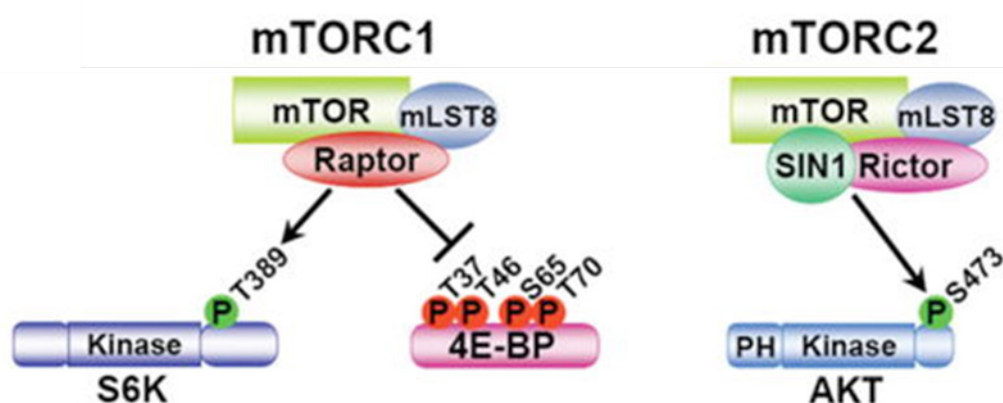


Figura 1.5. Complejos de mTOR (mTORC1 y mTORC2). Figura tomada de Huang, J et al. Biochemical Journal, 2008.

1.2.3.2. Regulación de mTORC1

El complejo multiproteico mTORC1 se encuentra altamente regulado. Por un lado, en presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la proteína inhibidora PRAS40 es fosforilada e inhibida por Akt, lo cual se traduce en una mayor actividad de mTORC1 (Sancak, 2007). Por otro lado, en ausencia de nutrientes o factores de crecimiento, AMPK se activa y fosforila a Raptor en la serina 792, esto promueve la asociación de Raptor con 14-3-3 inhibiendo a mTORC1 (Gwinn, 2008). De este modo, AMPK regula doblemente la ruta de mTORC1 a través de Raptor y TSC2 (Inoki, 2003).

¹ El dominio DEP se denomina así por las proteínas en las cuales estaba presente cuando se descubrió: The Dishevelled, EGL-10 y Pleckstrina (DEP). La función de estos dominios es la transducción de señales al interior celular mediante el reclutamiento de otras proteínas a la membrana celular.

El complejo TSC modula la actividad de mTORC1 a través de Rheb. Rheb-GTP se une al dominio FRB presente en mTOR, liberando a éste de la proteína inhibitoria denominada FKBP38, induciendo la activación de mTORC1 (Huang, 2008).

mTORC1 es inhibible por rapamicina debido a que el complejo FKB12-rapamicina compete con Raptor por la unión al dominio FRB de mTOR, provocando la inhibición del complejo de mTORC1 (Huang, 2008).

1.2.3.3. Funciones de mTORC1

mTORC1 es el regulador principal del crecimiento celular; como ya hemos mencionado, sensa e integra la disponibilidad de diversos factores nutricionales y medioambientales: factores de crecimiento, aminoácidos, nivel energético (ATP) y factores de estrés celular. Sus funciones son acoplar estas señales a una respuesta de crecimiento celular, favoreciendo procesos anabólicos mediante fosforilaciones de diversas dianas, como sería por ejemplo la síntesis lipídica o la traducción (síntesis de proteínas) y limitando algunos procesos catabólicos como la autofagia.

En presencia de aminoácidos, mTORC1 es translocado para su activación a la superficie de los lisosomas, donde reside Rheb (Figura 1.6). Este proceso es independiente de la vía PI3K/Akt y es necesaria la acción de las Rag-GTPasas (Rags), v-ATPasas, Ragulator y GATOR1/2 (actividad GAP sobre Rags), las cuales forman heterodímeros con Raptor (Sancak, 2008) (Zoncu, 2011).

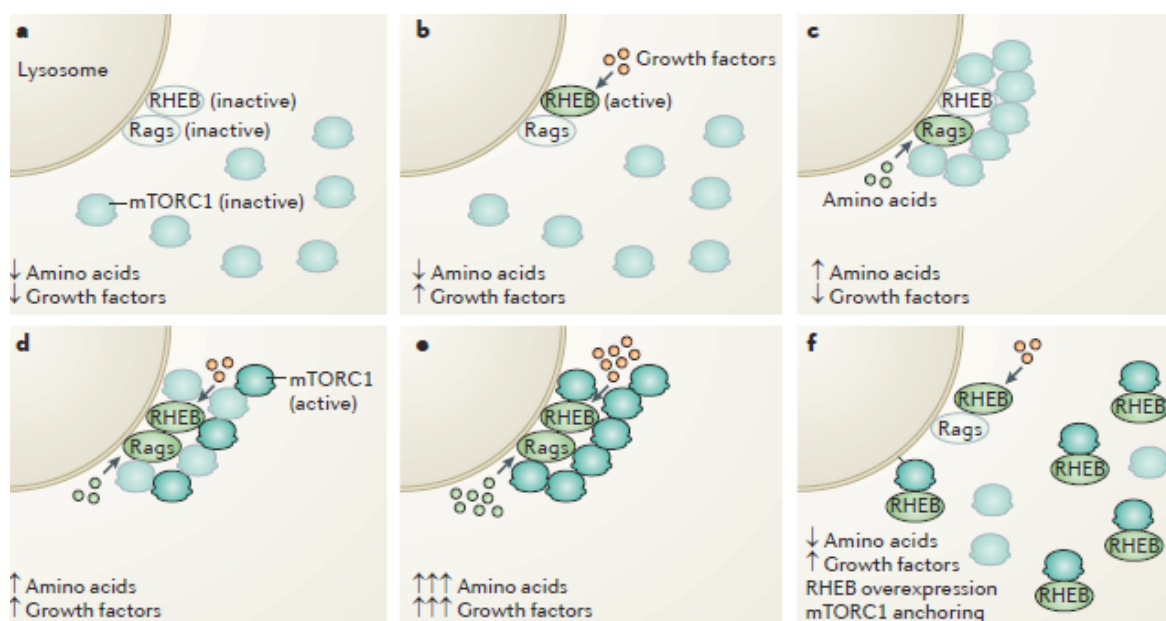


Figura 1.6. mTORC1 como integrador de señales energéticas y de factores de crecimiento.

A. En ausencia de aminoácidos y factores de crecimiento, Rag y Rheb GTPasas están inactivas, y mTORC1 esta físicamente disociado de Rheb. B. Los factores de crecimiento activan Rheb, sin embargo los aminoácidos son esenciales para la interacción de mTORC1 y Rheb, por lo que mTORC1 permanece inactivo. C. Los aminoácidos activan las Rags, las cuales reclutan a mTORC1 al lisosoma, permitiendo la interacción con Rheb. Sin embargo, en ausencia de factores de crecimiento, Rheb y mTORC1 permanecen inactivos. D. En presencia de aminoácidos y factores de crecimiento, Rheb recluta y activa a mTORC1. E. Mayor activación de mTORC1 en presencia de elevadas concentraciones de aminoácidos y factores de crecimiento. F. La sobreexpresión de Rheb puede activar a mTORC1 de manera independiente de Rag, en ausencia o bajas concentraciones de aminoácidos. Esquema adaptado de Zoncu, R., et al. 2011.

Activación de la síntesis de proteínas

En presencia de nutrientes y/o altos niveles energéticos, mTORC1 fosforila y activa a p70S6K (quinasa de S6 de 70 kDa) en treonina 308, y dicha modificación es requerida para la fosforilación en otro residuo proveniente de PDK1, para la completa activación de la proteína p70S6K. A su vez, p70S6K fosforila directamente a la proteína 40S ribosomal S6 en las serinas 235 y 236, activando tanto la iniciación como la elongación del proceso de traducción y el crecimiento celular.

Por otro lado, mTORC1 inactiva por fosforilación a 4E-BP1 (proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación). 4E-BP1 en su estado no fosforilado, inhibe la traducción del ARNm dependiente de “cap” mediante su unión con el factor eucariótico de iniciación a la traducción eIF-4E. La fosforilación de 4E-BP1 (por parte de mTORC1) libera a eIF-4E para restablecer la traducción dependiente de “cap”, que es particularmente importante para la traducción de ARNm con 5'UTRs altamente estructurados (Hara, 1997).

Inhibición de la autofagia

Además, la vía de mTORC1 inhibe por fosforilación a una proteína muy importante en la activación de la autofagia, ULK1 (Ser 757) (Kim, 2011).

Además, recientemente, se ha descubierto que en condiciones de crecimiento y niveles altos de energía, mTORC1 regula negativamente por fosforilación a TFEB (factor de transcripción EB) e inhibe su transporte al núcleo (Martina, 2012). Este factor de transcripción induce la expresión en el núcleo de genes relacionados con la biogénesis lisosomal y la autofagia (Sardiello, 2009).

Metabolismo: resistencia a la insulina, homeostasis lipídica y biogénesis mitocondrial.

Diferentes estudios han demostrado que la hiperactivación de la ruta mTORC1 se traduce en una desensibilización de la respuesta a la insulina por un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que la p70S6K (diana de mTORC1) fosforila en serina (307) a IRS-1. Esta fosforilación en serina impide que éstos IRS sean fosforilados por el IR en respuesta a la insulina (Shah, 2004).

Por otro lado, mTORC1 induce lipogénesis debido a que aumenta la transcripción de SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador del estero), la cual está implicada en la síntesis de ácidos grasos, adipogénesis (activa PPAR γ , receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas).

En cuanto a la homeostasis mitocondrial, mTORC1 es un regulador positivo de la biogénesis mitocondrial, induciendo además un aumento en el metabolismo oxidativo debido a la activación de PGC1 α (co-activador 1a del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas).

De manera interesante, el modelo de hiperactivación de mTORC1 de manera específica en célula $\beta Tsc2^{-/-}$ muestra una mayor expresión de genes mitocondriales, número de mitocondrias y contenido de ATP en animales jóvenes. Esto se traduce en una mayor secreción de insulina estimulada por glucosa (Koyanagi, 2011).

En conclusión, la vía de señalización de TSC2/mTORC1 se encuentra altamente regulada y regula un importante número de procesos biológicos en la célula. La siguiente figura (Figura 1.7) resume esta red de señalización celular y su regulación.

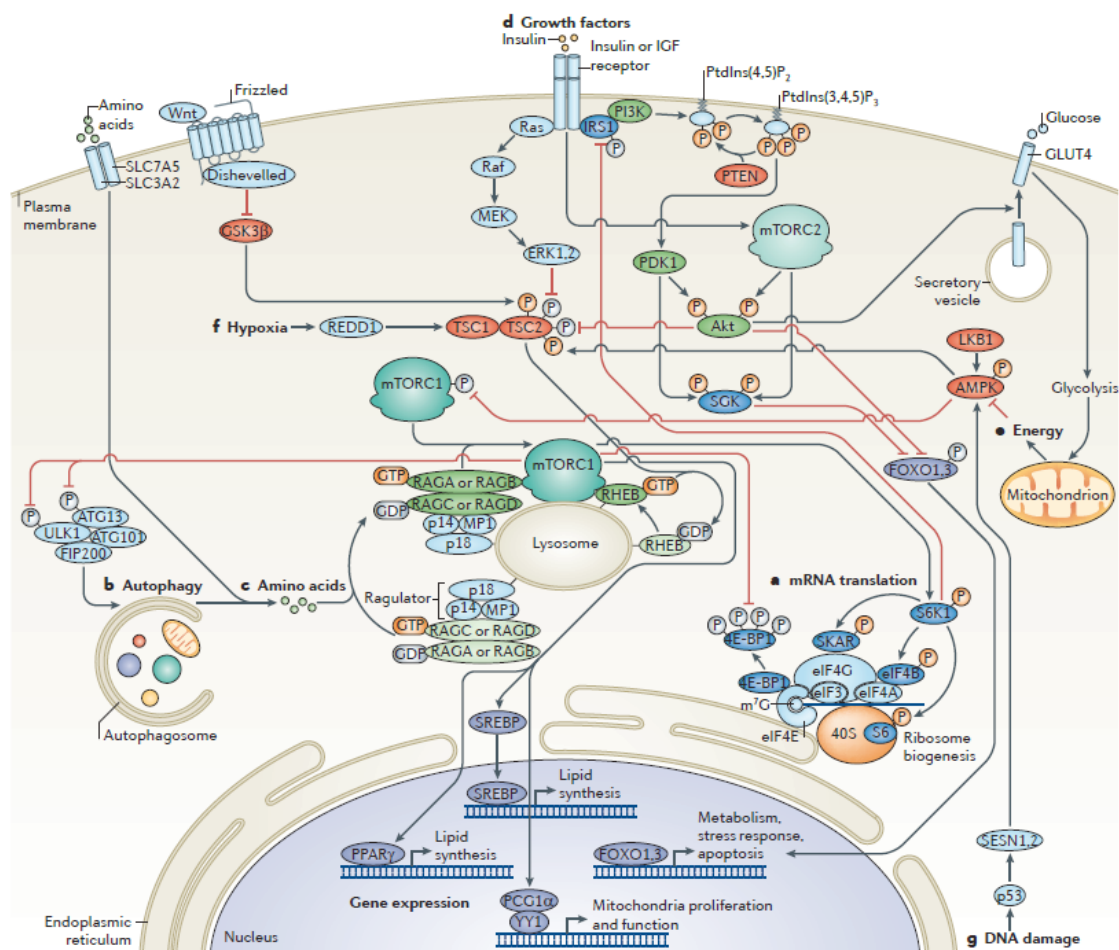


Figura 1.7. Esquema que representa las redes de señalización que convergen en la vía de TSC2/mTORC1. Esquema adaptado de Zoncu, R., et al. 2011.

1.2.3.4. Relación de mTORC1 con la enfermedad de cáncer y con el envejecimiento.

mTORC1 puede inducir tumorigénesis, hecho que se demuestra por la frecuente presencia de mutaciones (inactivantes) en proteínas inhibitoras de esta ruta (TSC1/2, LKB1 y PTEN) encontradas en pacientes con cáncer (Zoncu, 2010).

La pérdida de función de TSC2 (proteína supresora tumoral) conduce a un aumento en la expresión de la proteína Rheb unido a GTP (estado activo), induciendo una hiperactivación de la vía de mTORC1/p70S6K, y un aumento en la proliferación y crecimiento celular. Además la diana de la ruta de mTORC1, eIF-4E, es considerado como un proto-oncogén debido a que su sobreexpresión induce transformación celular y desarrollo de tumores (Bjornsti, 2004). Por último, mTORC1 forma parte de la ruta que regula la respuesta de células tumorales a nutrientes y factores de crecimiento, y controla el aporte de sangre y angiogénesis a través de efectos en células endoteliales y tumorales sobre VEGF (Chan, 2004) y HIF-1 α (Laplane, 2013). Por todo esto, es necesario el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas que selectivamente actúen en las células con una pérdida funcional del complejo de esclerosis tuberosa, como ya se ha empezado a estudiar en otros grupos de trabajo (Perrimon, 2015).

La señalización de insulina modula negativamente la longevidad en una gran variedad de organismos incluyendo gusanos, moscas y ratones (Johnson, 2013), y de manera opuesta, la rapamicina o un silenciamiento de mTOR o de la S6K1 son capaces de aumentar la longevidad en diferentes especies (Powers, 2006) (Robida-Stubbs, 2012). Además, la activación del complejo TSC1-TSC2 se ha demostrado que prolonga la longevidad en *Drosophila* (Kapahi, 2004). El envejecimiento o una dieta hipercalórica están relacionados con una hiperactivación de mTORC1, conduciendo a una autofagia defectiva y a un aumento en el estrés de RE, y en última instancia al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes (Klionsky, 2007). En este contexto, la restricción calórica (RC) modula cambios en los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y de sirtuinas (ver más adelante), y esto se relaciona con un aumento en la longevidad (Oslowski, 2011).

1.2.4. El complejo TSC1-TSC2 como nexo de integración de señales

1.2.4.1. Complejo de esclerosis tuberosa (TSC)

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es una enfermedad genética hereditaria de carácter autosómico dominante. Está caracterizada por un amplio espectro fenotípico, que afectan al SNC (epilepsia, alteraciones cognitivas y de comportamiento), lesiones en la piel y aparición de tumores benignos denominados hamartomas y tuberomas en diferentes órganos del cuerpo (cerebro, piel, retina, corazón, riñón y pulmón)². Dichos tumores son causantes de la aparición de diferentes manifestaciones clínicas basadas en la localización de los mismos (MacKeigan, 2015).

La incidencia de TSC es aproximadamente 1 de cada 6000 recién nacidos (Osborne, 1991). Sin embargo, existe variabilidad en el grado de la enfermedad, es decir, algunos pacientes presentan una forma leve de la enfermedad, y otros pueden presentar discapacidades severas. Debido a esto, la incidencia es difícil de calcular por la existencia de casos no diagnosticados de pacientes con poca afectación o individuos asintomáticos (Osborne, 1991).

Alrededor del 85% de los casos de TSC se debe a mutaciones en el gen *TSC1* (gen 1 de la esclerosis tuberosa) o en *TSC2* (gen 2 de la TSC). *TSC1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34) (van Slegtenhorst, 1997), y *TSC2* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) (European TSC Consortium, 1993). El resultado de estas mutaciones conduce a la proteína truncada con pérdida de su función. Debido a estas investigaciones, los genes *TSC1* y *TSC2* se clasifican como genes supresores de tumores (Cheadle, 2000)(van Slegtenhorst, 1997).

Dos tercios de los pacientes desarrollan TSC debido a mutaciones espontáneas en estos genes en la línea germinal, mientras que un tercio de los casos se considera de origen familiar o hereditario. Existen un 15-20% de los pacientes con TSC que cumplen criterios clínicos diagnósticos de la enfermedad pero no se han identificado mutaciones; en cuyo caso, la enfermedad es más leve. Se han identificado numerosas mutaciones en los genes *TSC1* y *TSC2* en pacientes con TSC, clasificadas como patogénicas y no patogénicas (Ver Tabla 1 en anexos, para más información).

² El nombre de esclerosis tuberosa (TSC) se debe a los crecimientos producidos en el cerebro, en forma de raíz, que se van calcificando con la edad y se vuelven duros.

1.2.4.2. Complejo TSC1-TSC2: Estructura proteica, localización y funciones

Los genes *TSC1* y *TSC2* dan lugar a las proteínas TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina) respectivamente, sin homología entre ellas y muy poca con otras proteínas. Ambas proteínas se asocian formando un complejo heterodimérico denominado TSC1-TSC2.

TSC1 es una proteína de expresión ubicua y está compuesta por 1164 aminoácidos (130 kDa). Presenta un dominio transmembrana entre los residuos 127 y 144, otro dominio responsable de la activación de la Rho GTPasa (residuos 145-510), y una región de interacción con el extremo N-terminal de TSC2 entre los aminoácidos 302 y 430. Además, cerca del extremo C-terminal, interacciona con la familia de proteínas llamada ERM (ezrina/radixina/moesina) (Napolioni, 2008). TSC1 se une y estabiliza a TSC2, bien previniéndolo de su degradación mediada por ubiquitinación, debido a que inhibe su interacción con HERC1 (E3 ubiquitina-proteína-ligasa) (Chong-Kopera, 2006), o bien ya que impide la unión de TSC2 a 14-3-3 (Li, 2002) (Figura 1.8).

La proteína TSC2 está formada por 1807 aminoácidos (200 kDa), y presenta un extremo N-terminal hidrofóbico, que contiene una cremallera de leucina (aminoácidos 81-121), y dos dominios en forma de *coiled-coil* o CCD (346-371 y 1008-1021). El CCD más cercano al extremo N-terminal (346-371) es el que interacciona con TSC1. Cerca de la zona C-terminal, TSC2 presenta una región muy conservada y con homología con las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) rap1GAP y mSPA1 (van Slegtenhorst, 1998) (Figura 1.8).

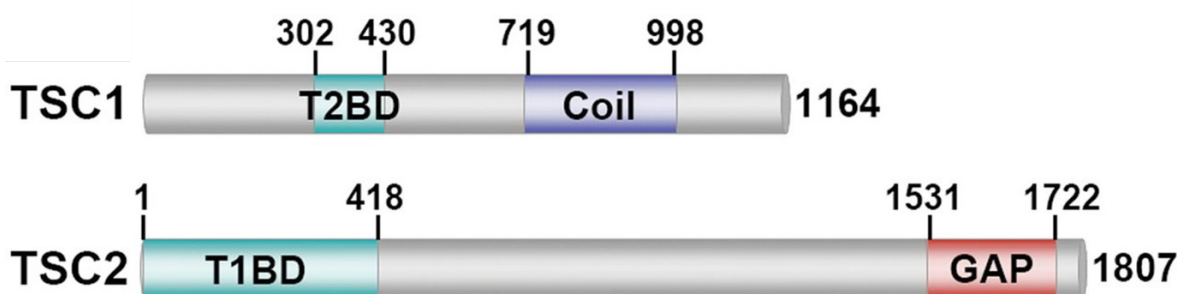


Figura 1.8. Estructura y dominios de las proteínas TSC1 y TSC2. T2BD (dominio de unión para TSC2), T1BD (dominio de unión para TSC1). Figura tomada de Huang, J et al. Biochemical Journal, 2008.

El complejo TSC1-TSC2 regula importantes vías de señalización en función del estado nutricional y energético celular, inhibiendo al complejo 1 de mamífero diana de la rapamicina (mTORC1). Bajos niveles de nutrientes y energía inducen la función GAP del TSC2 sobre Rheb (homólogo de Ras enriquecido en cerebro), lo que favorece su actividad GTPásica aumentando la conversión de Rheb-GTP a Rheb-GDP, e inactivando a mTORC1 (Huang, 2008) (Figura 1.9).

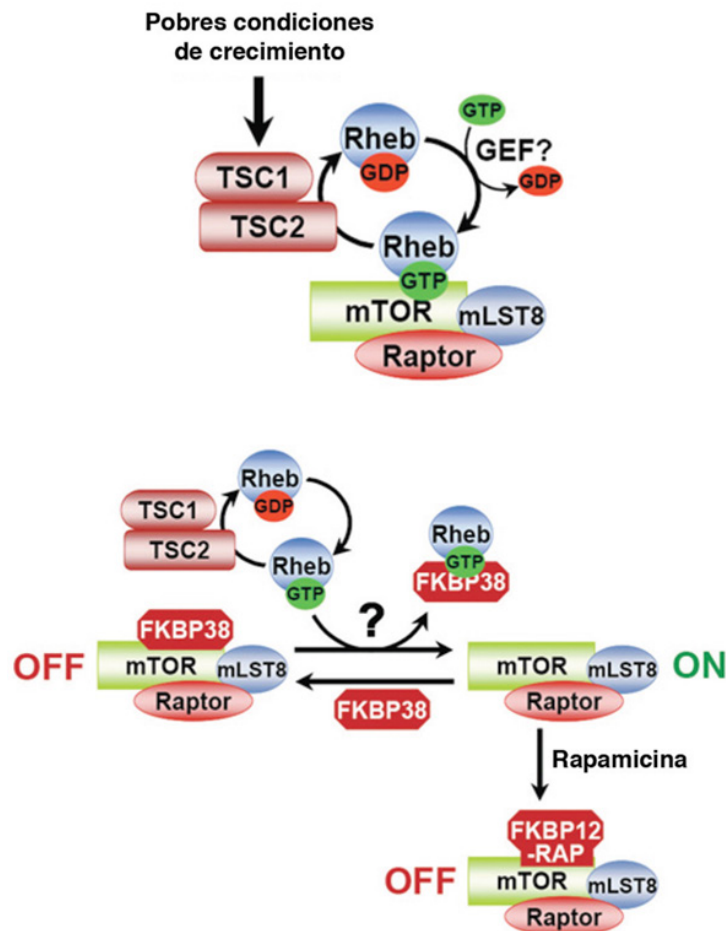


Figura 1.9. Regulación de mTORC1 mediada por la actividad GAP de TSC2. El complejo TSC modula la actividad de mTORC1 a través de una proteína G pequeña, Rheb. Rheb unido a GTP es un potente activador de mTORC1. El mecanismo de activación no está muy claro, pero se cree que la interacción de Rheb-GTP con FKBP38 libera a esta última del complejo mTORC1. Cuando FKBP38 se encuentra unido a mTOR, inhibe su actividad de una manera similar a la del complejo FKBP12-rapamicina. El complejo TSC1-TSC2, a través del dominio GAP de TSC2, con función activadora de GTPasa, promueve la actividad GTPasa intrínseca de Rheb, pasando de Rheb-GTP a Rheb-GDP, y por lo tanto inhabilitando la activación de mTORC1. Figura adaptada de Huang y Manning, 2008.

El complejo TSC1-TSC2 tiene múltiples sub-localizaciones. En células en fase G0 con una actividad disminuida de AKT, una proporción significativa de TSC2 está localizada en el núcleo. Cuando las células entran en ciclo celular, con una actividad de AKT aumentada, TSC2 se localiza principalmente en el citoplasma (Rosner, 2007). Sin embargo, en presencia de ROS, este complejo se localiza en la membrana de los peroxisomas y se activa, inhibiendo la ruta de mTORC1 (Zhang, 2013).

También, en situaciones de privación de aminoácidos el complejo TSC1-TSC2 se localiza en la membrana de los lisosomas, unido a un complejo de proteínas (Ragulator-Rag), inactivando la vía de mTORC1 (Sancak, 2010) (Demetriades, 2014) (Figura 1.8).

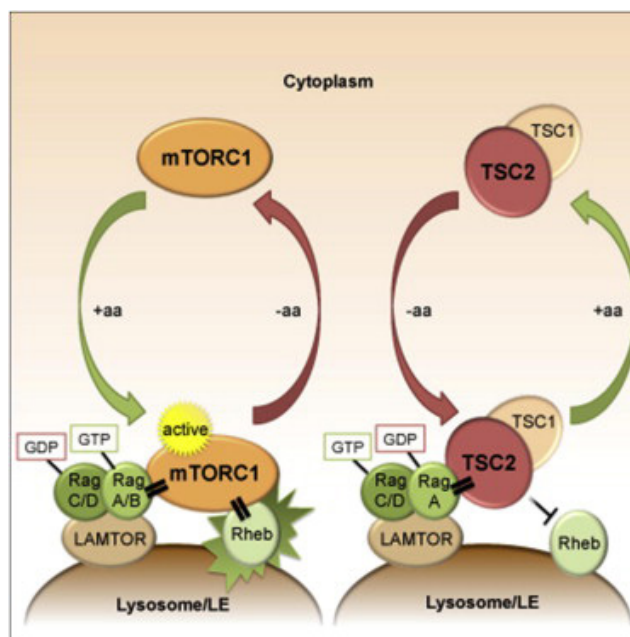


Figura 1.10. Regulación de mTORC1 en respuesta a privación de aminoácidos en la superficie lisosomal. Tras una privación de aminoácidos, las Rag GTPasas reclutan a TSC2 a la superficie lisosomal, donde ejerce su acción inhibitoria hacia Rheb. Solo cuando se inactivan las Rag GTPasas y Rheb, es cuando se produce la liberación de mTORC1 de la superficie de los lisosomas al citoplasma, y su consiguiente inactivación. Imagen tomada de Demetriades, et al. 2014.

1.2.4.3. Importancia de la vía TSC2 / mTORC1 en célula β

Prueba del gran interés que despertó el papel del complejo TSC1-TSC2 en célula β fue la aparición independiente de 4 modelos animales tejido-específicos en poco más de un año. Existen dos modelos de ratón *knock-out* de TSC2 específico de célula β (β Tsc2^{-/-}). Shigeyama y colaboradores describen la hiperactivación de mTORC1 y un aumento temprano de la masa de célula β por hipertrofia celular, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia, además de función secretora aumentada. También describen resistencia a la insulina en islotes debido a la hiperactivación de S6K. Sin embargo a partir de las 35 semanas, la masa de célula β disminuye y los animales desarrollan diabetes severa. El tratamiento con rapamicina (inductor de la autofagia, ver capítulo Autofagia) en animales β Tsc2^{-/-} impide el fracaso de la masa de célula β (Shigeyama, 2008) (Bartolomé, 2014). Además este trabajo demuestra como el aumento de la señalización de mTORC1 es comúnmente encontrado en islotes de otros modelos de compensación de masa de célula β , tales como db/db o animales alimentados con dieta grasa.

Por otro lado, el modelo β Tsc2^{-/-} estudiado por el grupo de Bernal-Mizrachi tiene un fenotipo similar al anterior, pero los autores no describen mayor secreción de insulina, ni una segunda fase de fracaso de la masa de célula β (Rachdi, 2008). En paralelo, el grupo de Guan generó el modelo β Tsc1^{-/-}, reafirmando la aparición de hipertrofia de célula β , hiperinsulinemia e hipoglucemia, sin embargo este trabajo solo estudia animales jóvenes (Mori, 2009). Por último, el grupo de Yokono generó un modelo transgénico que expresaba una forma constitutivamente activa de Rheb específicamente en las células β pancreáticas, y que de nuevo presentaba hiperinsulinemia y mejora de la tolerancia a la glucosa mediado por un aumento en la masa de célula β debido a una hipertrofia celular (Hamada, 2009).

1.2.4.4. Regulación del complejo TSC1-TSC2 por fosforilación, acetilación e interacción con otras proteínas

Debido a la importancia de este complejo, éste se encuentra altamente regulado, y las modificaciones del mismo pueden afectar a la estabilidad del complejo, funcionalidad o sub-localización celular.

Fosforilaciones.

Por un lado, las proteínas TSC1 y TSC2 se encuentran moduladas por fosforilaciones, activadoras o represoras de la función, y fundamentalmente se localizan en TSC2, aunque también pueden darse en TSC1.

- Fosforilaciones activantes del complejo

En condiciones de privación energética y/o nutrientes, o ante una situación de estrés celular, el complejo TSC1-TSC2 se activa, inhibiendo la vía mTORC1. En estas condiciones, TSC1-TSC2 se localiza fundamentalmente en la superficie lisosomal, y minoritariamente en el citoplasma y en el aparato de Golgi (Menon, 2014) (Demetriades, 2014). Cuando los niveles de ATP disminuyen (disminuye el ratio ATP/AMP), la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) se activa, e interacciona con la región C-terminal del TSC2 fosforilándolo en los residuos treonina 1227 y serina 1345. Dichas fosforilaciones provocan la estabilización de la proteína TSC2 (Inoki, 2003) y la activación del complejo TSC1-TSC2.

GSK3 β fosforila a TSC2 en múltiples residuos, y de manera sinérgica con AMPK, estabilizan la acción supresora de TSC2 sobre mTORC1. Asimismo, TSC1 también puede sufrir fosforilaciones que promuevan su unión con TSC2, como por ejemplo las provenientes de la glucógeno sintasa 3 β (GSK3 β) (Mak, 2005).

- Fosforilaciones inactivantes de la función del complejo

Las señales mitogénicas extracelulares conducen a una entrada en ciclo celular mediada por la activación de las proteínas quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Una de ellas, la CDK1/ciclina B1 regula negativamente por fosforilación a TSC1 durante la transición G2/M del ciclo celular (Astrinidis, 2014). De manera similar, los mitógenos activan la ruta Ras-MAPK, la cual puede inhibir el complejo TSC1-TSC2, activando mTORC1. Erk 1/2 es capaz de fosforilar directamente a la serina 664 de TSC2, inactivándolo (Ma, 2007), e indirectamente mediante la activación de RSKs, la cual fosforila a TSC2 (serinas 939 y 1798, y treonina 1462). Estas fosforilaciones provocan la disociación de TSC1 y TSC2 inhibiendo su acción sobre Rheb (Roux, 2007).

TSC1 puede ser también modulado negativamente por la IKK β ³ o en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, como por ejemplo el factor α de necrosis tumoral o TNF α (Lee, 2007).

³ Las IKKs son las quinasas inhibidoras de los I κ B (inhibidores del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas o NF κ B).

La vía PI3K-AKT-mTORC1 regula negativamente el complejo TSC1-TSC2. Cuando Akt se activa en respuesta a insulina y a factores de crecimiento, fosforila directamente a TSC2 en los residuos de serina 939, 981, 1130, 1132 y treonina 1462, inhibiendo su acción sobre Rheb. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual dichas fosforilaciones inhiben la funcionalidad del complejo TSC1-TSC2 no está claro y ha sido objeto de un gran debate. Una hipótesis sostiene que dichas fosforilaciones impiden la formación del complejo TSC1-TSC2, favoreciendo la activación de mTORC1 (Potter, 2002), mientras que otro trabajo defiende que lo más probable es que TSC2 sea más susceptible de degradación por interacción con 14-3-3 (Nellist, 2002) (Li, 2002). Otros autores apoyan que estas fosforilaciones provenientes de Akt provocan la disociación de TSC2 del lisosoma impidiendo su acción sobre Rheb (Cai, 2006) (Menon, 2014), o bien porque favorecen el transporte de TSC2 del citoplasma al núcleo (Rosner, 2007).

La vía de señalización de Wnt lleva a la inhibición de la acción de GSK3 β sobre TSC2, promoviendo así la activación de mTORC1 (Inoki, 2006).

Interacción con otras proteínas

Por otro lado, el complejo TSC1-TSC2 también se encuentra modulado por interacción con otras proteínas. Recientemente, se ha descubierto un tercer componente del complejo TSC1-TSC2, denominado TBC1D7 (miembro 7 dominio 1 de la familia Tre2-Bub2-Cdc16). Este último, estabiliza el complejo TSC-TBC mediante su unión a TSC1 y posee un dominio GAP hacia Rheb, inhibiendo mTORC1 (Dibble, 2012). Al contrario, se ha descrito que la proteína de unión a la quinasa de adhesión focal de 200 kDa (FIP200) interacciona y regula negativamente al complejo TSC1-TSC2, inhibiendo su formación, promoviendo el tamaño celular (Gan, 2005).

En respuesta a insulina, Akt es fosforilado y promueve la exclusión del núcleo y la fosforilación del factor de transcripción nuclear FoxO1 (*Forkhead* cuadro O1). FoxO1 fosforilado en el citoplasma, interacciona con TSC2, lo cual promueve la desestabilización del complejo, y como consecuencia, activa mTORC1 (Cao, 2006).

Por último, en condiciones de hipoxia, REDD1 se activa y suprime la activación de mTORC1, debido a que inhibe la interacción de TSC2 con la proteína inhibitoria 14-3-3 (DeYoung, 2008). En la siguiente figura (Figura 1.10) se presenta un esquema a modo de resumen de la regulación del complejo TSC1-TSC2.

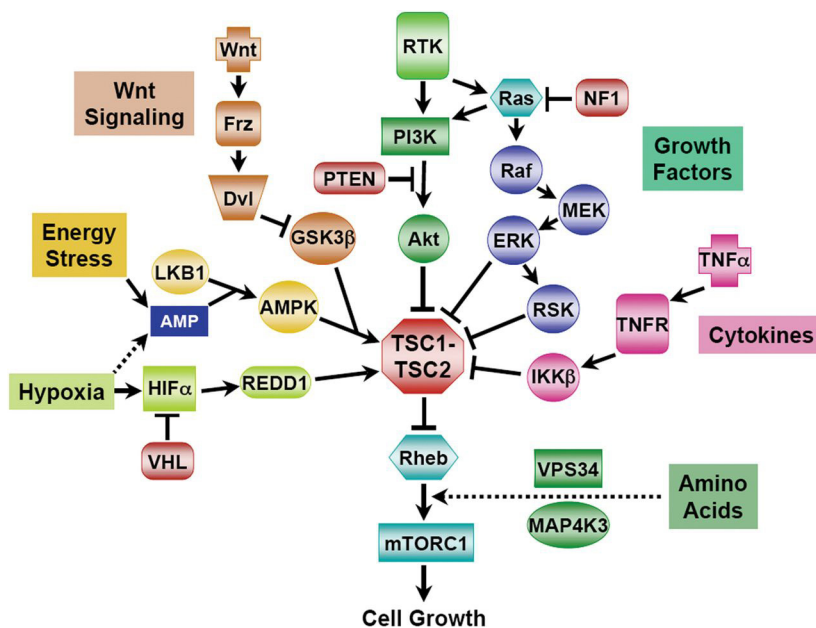


Figura 1.11. Regulación del complejo TSC1-TSC2. La actividad del complejo TSC1-TSC2 es regulado mediante fosforilaciones en diferentes residuos o interacciones con otras proteínas.

Acetilación

Apenas se conoce el papel que juega la acetilación en la regulación del complejo TSC1-TSC2. Actualmente, en la literatura solo hay un trabajo en el cual estudian que la proteína acetiltransferasa N-terminal ARD1 se une a TSC2 y lo acetila en dicha posición. Dicha modificación provoca una mayor estabilización de la proteína (Kuo, 2010).

1.3 REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ACETILACIÓN Y DESACETILACIÓN

1.3.1. La acetilación en lisinas

La acetilación en lisinas es una modificación postraduccional (PTM) reversible por la cual acetil transferasas en lisinas o KAT (anteriormente denominadas acetil transferasas de histonas o HAT) catalizan la transferencia de un grupo acetilo unido a la coenzima A (acetil-CoA) al grupo ϵ -amino(N) de residuos de lisinas de histonas y proteínas. La reacción inversa es llevada a cabo por enzimas deacetilasas, que serán descritas con mayor detalle más adelante. La conversión de una lisina con carga positiva a una lisina acetilada altera la estructura de la proteína y su interacción con otras biomoléculas. Por ejemplo, la acetilación de histonas reduce la interacción electrostática entre el DNA y la histona, relajando la cromatina y permitiendo la transcripción.

Aunque las KAT fueron consideradas inicialmente de localización nuclear, hay un creciente número de trabajos publicados que sostienen que tienen un transporte núcleo-citoplasma. Existen numerosas KAT, aunque HAT1 es la primera KAT descubierta en levaduras en el año 1995. Actualmente, las KAT se subdividen en familias, las cuales, se encuentran resumidas en la siguiente tabla (Tabla 1.1).

La primera proteína citosólica acetilada descubierta fue la α -tubulina (L'Hernault, 1985); pero no fue hasta el año 2009 cuando se nombró a su N-acetil transferasa con el nombre de ELP3/KAT9.

Tabla: Acetiltransferasas en lisinas (KAT)					
Nombre nuevo	Nombre formal en humano	Nombre formal en <i>Drosophila melanogaster</i>	Nombre formal en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nombre formal <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Complejos de HAT
Familia GNAT					
KAT1	HAT1	CG2051	Hat1	Hat1/Hag603	HAT-B
KAT2		dGCN5/PCAF	Gcn-5	Gcn-5	SAGA/ADA/ATAC
KAT2A	hGCN5				STAGA/TFTC
KAT2B	PCAF				PCAF
KAT9	ELP3	dELP3/CG15433	Elp3	Elp3	Elongación de la RNA polimerasa 2
Familia p300/CBP					
KAT3		dCBP/NEJ			
KAT3A	CBP				
KAT3B	P300				
Familia MYST					
KAT5	TIP60/PLIP	dTIP60 (CG1894)	Esa1	Mst1	NuA4
KAT6			Sas3	(Mst2)	NuA3
KAT6A	MOZ/MYST3				
KAT6B	MORF/MYST4				
KAT7	HBO1/MYST2			(Mst2)	
KAT8	hMOF/MYST1	dMOF (CG1894)	Sas2	(Mst2)	MSL

Tabla 1.1. Familias de KAT. Familias de GNAT (N-acetil transferasa relacionadas con Gcn-5); de p300 (proteína de 300 kDa asociada a E1A)/ CBP (proteína de unión a CREB) y de MYST (nombre derivado de los miembros más importantes que la componen, MOZ, yeast YBF2, Sas2 y Tip60). Tabla adaptada de Sadoul, K. et al. 2010.

1.3.2. La desacetilación y tipos de desacetilasas de histonas (HDAC): las sirtuinas.

Las desacetilasas de histonas (HDAC) son un grupo de enzimas muy conservadas evolutivamente. Hay cuatro clases de HDAC en humanos basadas en su estructura: las HDAC de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), de clase IIa (HDAC4, 5, 7 y 9), de clase IIb (HDAC6 y 10), de clase III (sirtuinas) y de clase IV (HDAC11).

Las sirtuinas o desacetilasas de histonas de clase III, cuyo nombre proviene del ortólogo en levaduras *Sir2*, constituyen una familia de enzimas altamente conservadas en la evolución (Blander, 2004). Las sirtuinas catalizan la desacetilación de proteínas con lisinas acetiladas en residuos ϵ -amino, utilizando como cosustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD⁺). Se conocen siete sirtuinas en mamíferos (SIRT1-7) cuyas características se encuentran resumidas en la siguiente tabla (Tabla 1.2):

Isotipo	Localización subcelular	Expresión en tejidos	Funciones	Actividad enzimática
SIRT1	Nuclear y citosólica	Cerebro, músculo esquelético, corazón, riñón, y útero	Supervivencia, longevidad, regulación del metabolismo, inflamación, respuesta a estrés oxidativo	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT2	Citosólica y nuclear	Cerebro	Regulación del ciclo celular, desarrollo del sistema nervioso.	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT3	Mitocondrial, nuclear y citosólica	Cerebro, corazón, hígado, riñón, tejido adiposo marrón	Regulación del metabolismo mitocondrial	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT4	Mitocondrial	Células β pancreáticas, hígado, riñón, corazón, cerebro	Regulación del metabolismo mitocondrial y apoptosis	ADP-ribosiltransferasa
SIRT5	Mitocondrial	Cerebro, corazón, músculo.	Apoptosis	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT6	Núcleo, asociado a heterocromatina	Músculo, cerebro, corazón, ovario y hueso	Estabilidad genómica, reparación del DNA	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente, ADP-ribosiltransferasa
SIRT7	Nucleolo	Sangre	Regulación de la transcripción y del ciclo celular	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente

Tabla 1.2. Distribución subcelular y papel fisiológico de los siete isotipos de sirtuinas.

Las sirtuinas catalizan dos reacciones importantes: la desacetilación y la ADP-ribosilación, resumidas en la siguiente figura (Figura 1.12). La desacetilación consiste en la eliminación de los grupos acetilo de las lisinas y la formación de nicotinamida (NAM) y O-acetil-ADP-ribosa como productos de la reacción.

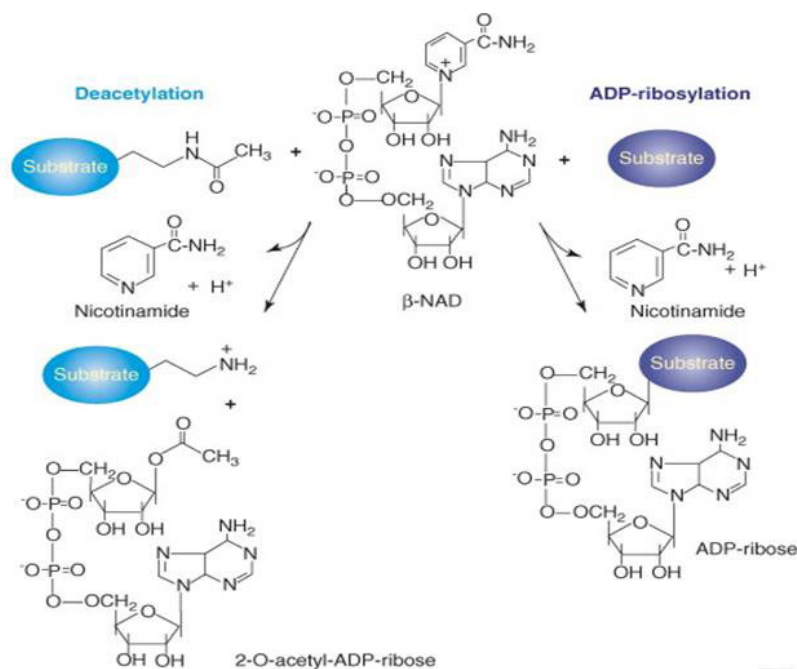


Figura 1.12. Esquema de las reacciones típicas catalizadas por las sirtuinas. Las sirtuinas según su isotipo pueden catalizar la desacetilación de proteínas y/o catalizar la ADP-Ribosilación. Figura adaptada de Westphal, et al 2007.

La NAM puede dar lugar a nicotinamidamononucleótido (NMN) mediante la acción de la enzima visfatina o Nampt presente en las células. El NMN es el intermediario en la síntesis de NAD^+ . Ésta es la ruta salvaje de la biosíntesis de NAD^+ aunque también se puede sintetizar a partir del triptófano (ruta de *novo*) o del ácido nicotínico (NA) (Yamamoto, 2007) (Figura 1.13).

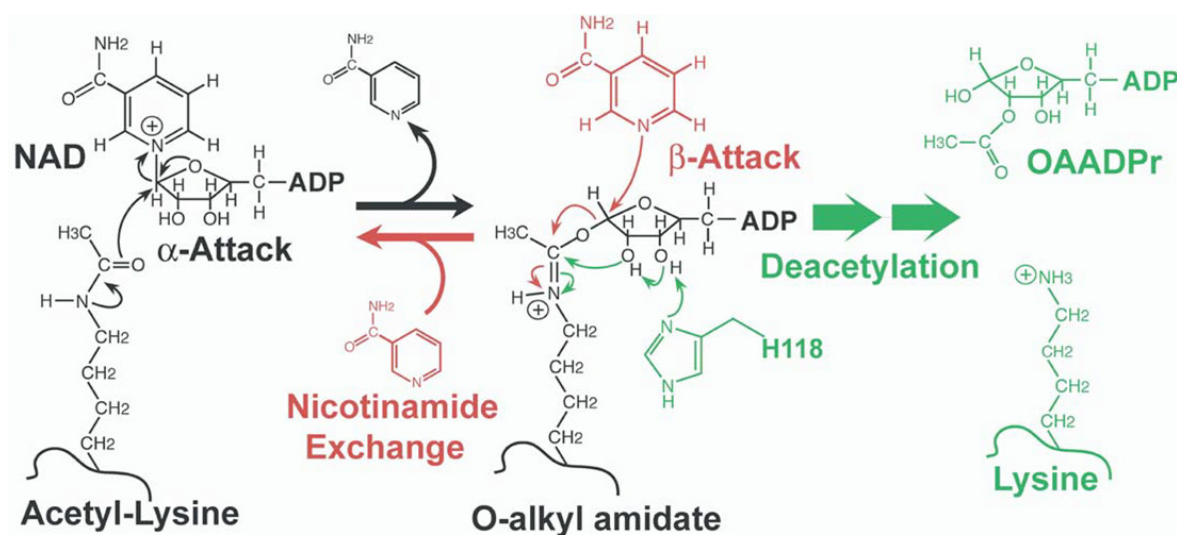


Figura 1.13. Principales vías de biosíntesis de NAD^+ . Síntesis de novo a partir del triptófano, ruta salvaje a partir de NAM por la enzima visfatina, y a partir del ácido nicotínico. Figura adaptada de Yamamoto et al. 2007.

El producto de reacción de desacetilación de las sirtuinas, la NAM actúa como un inhibidor no competitivo de las sirtuinas (Bitterman, 2002), permitiendo a estas enzimas a ser reguladas tanto

por nicotinamida como por NAD⁺. La NAM inhibe la reacción de desacetilación debido a que reacciona con un intermediario de la reacción (O-alquil-amidato), proceso que es denominado como intercambio de nicotinamida (*nicotinamide exchange*). Altas concentraciones de NAM favorecen dicho proceso, inhibiendo la reacción de desacetilación, tal como se muestra en la siguiente figura (Figura 1.14) (Avalos, 2005).

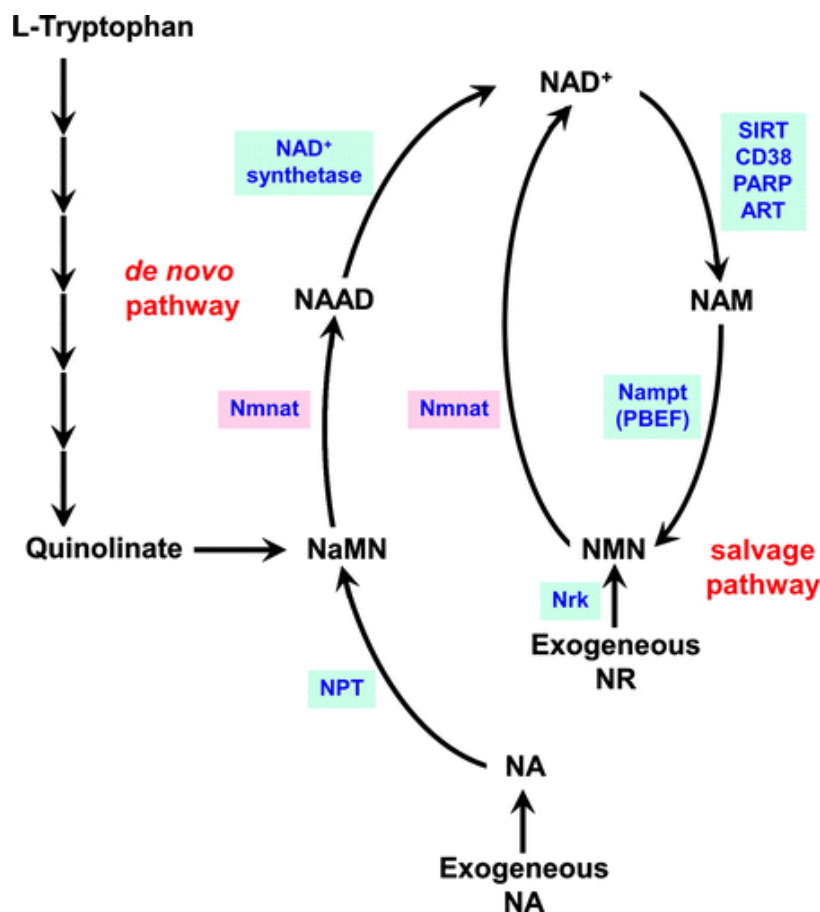


Figura 1.14. Mecanismo de regulación de las sirtuinas por NAM (imagen superior) y mecanismo de desacetilación por NAD⁺ (imagen inferior). El mecanismo de desacetilación comienza con el ataque nucleofílico del NAD⁺ a la lisina acetilada del péptido sustrato, formando el intermediario de la reacción (O-alquil amidato). A continuación este intermediario se activa mediante una histidina, promoviendo la reacción de desacetilación. Sin embargo, si este intermediario reacciona con la NAM, la reacción de desacetilación se inhibe (imagen superior). En ausencia del péptido sustrato de desacetilación (color azul), NAD⁺ puede unirse a los bolsillos de las sirtuinas A y B en una conformación inactiva. En presencia del péptido sustrato de desacetilación, el NAD⁺ se une a la enzima sirtuina con una conformación específica (unión al bolsillo C), activando a la enzima (imagen inferior). Imágenes tomadas de Avalos, J.L., et al. 2005.

1.3.2.1. SIRT1 y metabolismo

De los siete isotipos de sirtuinas en mamíferos, es SIRT1 la proteína más estudiada de la familia. Aunque SIRT1 se encuentra predominantemente en el núcleo, también puede localizarse en el citoplasma en determinadas situaciones gracias a que en su estructura proteica presenta secuencias de localización y de exclusión nuclear (Tanno, 2007).

SIRT1 es inducido por restricción calórica (RC). La RC activa la quinasa de la adenina mononucleótido (AMPK), la cual aumenta los niveles de NAD⁺ y activa a SIRT1 (Cantó, 2011). Está demostrado que esta enzima participa en varios procesos fisiológicos como son: el control del ciclo celular, la resistencia al estrés, la apoptosis, la diferenciación celular y el metabolismo energético, entre otros. Además, se ha sugerido que SIRT1 aumenta la longevidad de los organismos y protege frente al cáncer (Brooks, 2009).

Por un lado, SIRT1 inhibe la proliferación ya que regula negativamente a mTORC1 (Ghosh, 2010). El grupo de Ghosh y colaboradores describieron por primera vez que SIRT1 interacciona con TSC2 en células HeLa, sin embargo, no está descrito si TSC2 está modulado por acetilación/desacetilación. En el trabajo de Kuo identificaron que la acetil transferasa N-terminal ARD1 interacciona con TSC2, promoviendo su estabilización, conduciendo a una disminución en la señalización de mTORC1 y esto está relacionado con una inhibición del crecimiento de líneas celulares de tumores humanos de mama (Kuo, 2010).

En relación con el metabolismo, son numerosas las dianas que se regulan por acetilación/desacetilación, muchas de ellas están implicadas en la vía de la señalización de la insulina. Una de ellas, es PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B), proteína implicada en la defosforilación del IR, IRS1 o 2, disminuyendo la vía de señalización de la insulina. PTP1B es regulado negativamente, entre otros, por desacetilación mediada por SIRT1, por lo que la activación de SIRT1 favorece la señalización de insulina en ratones con un fenotipo diabético (*Irs2*^{-/-}) (González-Rodríguez, 2015). Los factores transcripcionales de la familia de FoxO también están regulados positivamente por acetilación mediada por CBP/p300 en respuesta a un daño por estrés oxidativo (Motta, 2004). Mientras que dichas proteínas también son dianas de desacetilación por la actividad de las sirtuinas, cuya regulación puede tener un efecto positivo (Brunet, 2004) o negativo (Motta, 2004) en su actividad.

El ratón que sobreexpresa SIRT1 en la célula β pancreática (BESTO) muestra una mejora de la tolerancia a la glucosa y un aumento de la secreción de insulina debido a que SIRT1 desacetila e inactiva UCP2, provocando un aumento en la síntesis de ATP, y ello favorece la secreción de insulina (Bordone, 2006)

Otra diana activada por desacetilación mediada por SIRT1 es PGC-1 α . En el músculo y en el tejido adiposo marrón produce activación de la termogénesis, lo cual protege frente a la aparición de obesidad y disfunción metabólica (Yamamoto, 2007).

Como conclusión, se plantea la idea del uso de activadores de SIRT1 como el resveratrol en el tratamiento de la diabetes tipo 2, ya que son capaces de disminuir la resistencia a la insulina y favorecen la supervivencia de la célula β pancreática (Houtkooper, 2012).

1.4 EL SISTEMA UBIQUITIN-PROTEASOMA Y LA AUTOFAGIA EN EL CONTROL DE CALIDAD CELULAR

La regulación de la expresión génica ocurre a distintos niveles, desde el control de la transcripción hasta las modificaciones postraduccionales (PTM) que sufren las proteínas. Existe una gran variedad de PTM, algunas de las más importantes son la metilación, la acetilación, la fosforilación, la sumoilación y la ubiquitinación. Como consecuencia, se amplía el abanico de los efectos moduladores sobre las proteínas, pudiendo afectar a su función biológica, localización celular, su capacidad para interactuar con otras proteínas o bien, conducir a la proteína a su degradación. Es necesario para la supervivencia celular el mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas.

1.4.1 El sistema ubiquitin-proteasoma (UPS)

La ubiquitinación es un proceso enzimático postraducciona l de las células eucariotas que fue descubierto en el año 1975 por el grupo del Dr. Ciechanover, y consiste en la unión covalente de la ubiquitina (Ub)⁴ a otra proteína, lo cual la marcará para su envío al proteasoma 26S, donde será posteriormente degradada.

Dichas proteínas contienen en su estructura unas señales que la marcan para su degradación (Ravid, 2008), y generalmente son proteínas de vida corta, dañadas o parcialmente plegadas (Shang, 2012). De hecho, normalmente existen dos caminos para la degradación de proteínas: la vía vesicular mediada por los lisosomas y la vía citosólica mediada por la ubiquitinación. La ubiquitinación presenta al menos tres variantes: a) mono-Ub, b) multi-Ub y c) poli-Ub; y consta de una serie de pasos. En primer lugar, la activación de una molécula de Ub por la enzima E1 (de activación), seguido de la transferencia de la ubiquitina de E1 a la enzima E2 (de conjugación), y finalmente la ligación por enlace isopeptídico entre la glicina del carbono terminal de la Ub con la lisina de la proteína diana gracias a la acción de las enzimas E3 (de ligación).

También se han descrito E3 ubiquitin ligasas capaces de ubiquitinar otros residuos (además de la lisina) como serina, treonina o cisteína en el sustrato. Una vez que la ubiquitina se ha unido a la proteína, se empiezan a agregar más moléculas de ubiquitina, dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica que le permite al proteasoma identificar y degradar la proteína. El proceso de ubiquitinación es reversible, y está mediado por enzimas deubiquitininas (DUBs), las cuales interactúan con el complejo E3-sustrato y lleva a cabo la eliminación de moléculas de ubiquitina (M.B. Nijman, 2005).

El proteasoma 26S, en donde se degradan las proteínas marcadas con poli-Ub, puede localizarse en el núcleo celular o en el citoplasma. Estructuralmente, el proteasoma es un complejo proteico conformado por un “núcleo” con forma de barril (20S) y dos unidades reguladoras (cada una 19S). Este núcleo está compuesto por cuatro anillos apilados alrededor de un poro central; los dos anillos internos contienen subunidades proteicas β , conformando los sitios activos de

⁴ La secuencia humana de la ubiquitina (76 aminoácidos) está muy conservada en los eucariontes, y es la siguiente: MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLLRG

las proteasas, y los dos anillos exteriores contienen subunidades α , cuya función es reconocer los compuestos poliubiquitínicos en los sustratos de las proteínas e iniciar la proteólisis.

El proteosoma rompe el sustrato en péptidos pequeños, los cuales serán degradados después a aminoácidos libres por endo y aminopeptidasas.

Dicha degradación tiene como funciones principales la eliminación de productos que no son útiles para la célula en determinadas situaciones, o cuya acumulación puede ser tóxica; además, los productos de esta degradación son reutilizados para la síntesis de nuevas moléculas o son metabolizados para la obtención de energía (Shang, 2012).

1.4.2 Autofagia y mitofagia

La autofagia⁵ es un proceso fisiológico mediante el cual proteínas u orgánulos citoplasmáticos son conducidos a los lisosomas para su degradación, confiriendo a la célula eucariota una vía de degradación alterativa al sistema ubiquitin-proteasoma.

La primera función de la autofagia que se describió fue la de adaptación al ayuno, sin embargo, es muy importante también en el control de calidad citoplasmático, eliminando proteínas mal plegadas o defectuosas, orgánulos dañados o microorganismos infecciosos; atenuando el estrés de RE (Murrow, 2013). Además, favorece la supervivencia celular en situaciones de estrés, ya que permite la obtención de nutrientes y energía a través de la degradación de componentes citosólicos (Klionsky, 2007).

1.4.2.1. Tipos de autofagia y maquinaria autofágica

Existen tres tipos de autofagia (Figura 1.15):

Macroautofagia (en adelante referida como autofagia): Este proceso comienza con la formación de novo de una cisterna membranosa (proveniente del RE, y otros compartimentos como la membrana externa mitocondrial, membrana plásmatica o el aparato de Golgi), que crece en longitud y es denominada fagóforo. Las membranas del fagóforo crecerán en extensión y terminarán por unir sus extremos para formar un compartimento cerrado denominado autofagosoma, que posee doble membrana. El autofagosoma puede recibir vesículas desde los endosomas o puede llegar a fusionarse directamente con ellos. Los endosomas aportan proteínas lisosomales y bombas de protones, lo que va provocando la acidificación del fagosoma. Al compartimento resultante se le denomina anfisoma. Como último paso, el anfisoma se fusiona con los lisosomas dando lugar a los autolisosomas, en los que por la acción de las proteasas o catepsinas lisosomales se degrada el material encerrado.

El secuestro de estos componentes citosólicos puede ser no selectivo (*bulk autophagy*) o selectivo, desde una degradación específica de mitocondrias (mitofagia, vista en detalle más adelante) hasta la eliminación de vesículas de secreción (crinofagia) y otras (Figura 1.15).

Microautofagia: En este caso la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, donde son degradadas. En estas invaginaciones se incorpora material citosólico.

⁵ La palabra autofagia fue acuñada por C. de Duve en 1963 y significa comer (fagia) propio (auto).

Autofagia mediada por chaperonas (CMA): Mediante este proceso, la chaperona citosólica (hsc70) reconoce una secuencia específica en las proteínas citosólicas (KFERQ) y las lleva a la membrana lisosomal, donde se introducen en el interior del lisosoma gracias a un transportador localizado en la membrana del lisosoma (LAMP-2A) (Singh, 2011) (Cuervo, 2011).

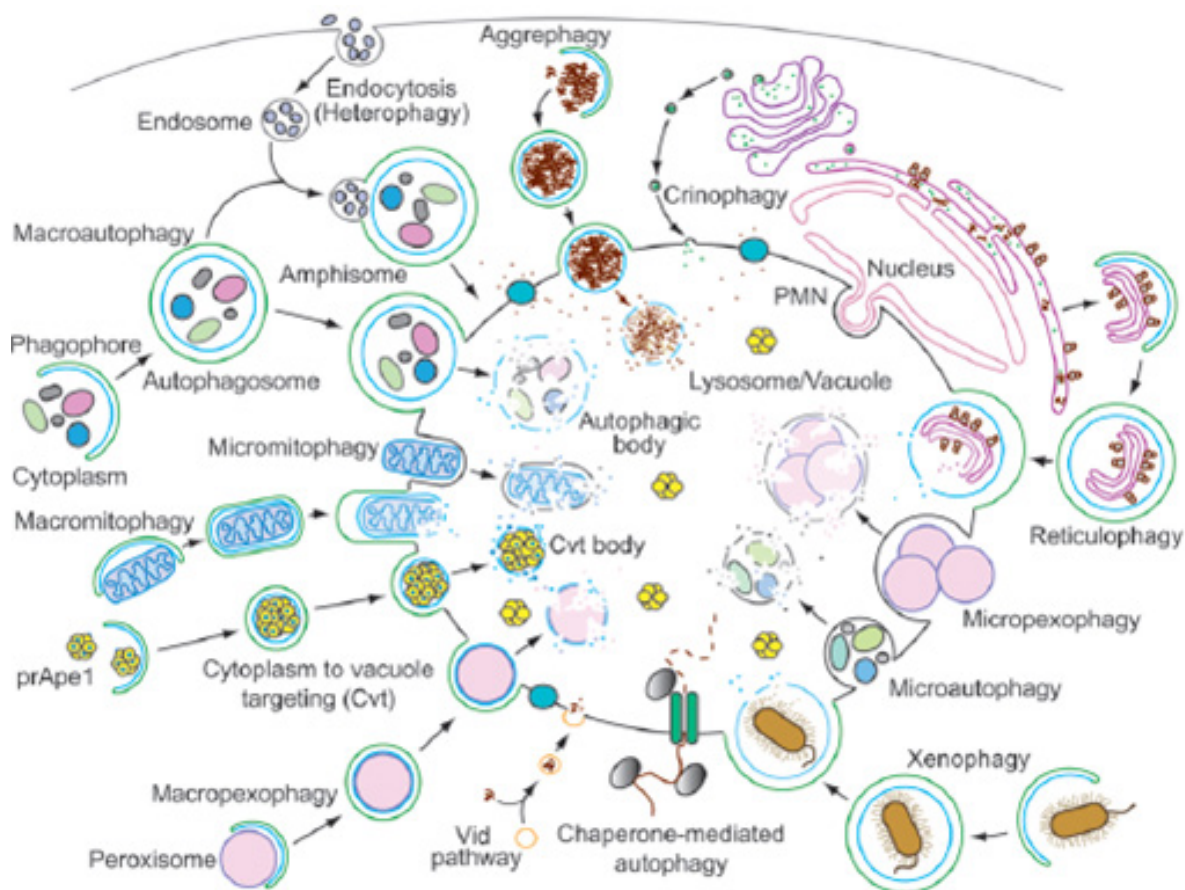


Figura 1.15. Tipos de autofagia. Esquema de los diferentes procesos en los que está envuelto el sistema lisosomal/vacuolar. Esquema de Klionsky, et al. 2007

Aunque la autofagia es bien conocida desde la década de 1960, no empezó a caracterizarse molecularmente hasta el descubrimiento de las proteínas Atg (genes relacionados con la autofagia) en levaduras (Tsukada, 1993). Se han identificado hasta ahora 34 proteínas Atg en levaduras (Shpilka, 2011), de algunas de las cuales han sido identificadas sus funciones (Figura 1.16).

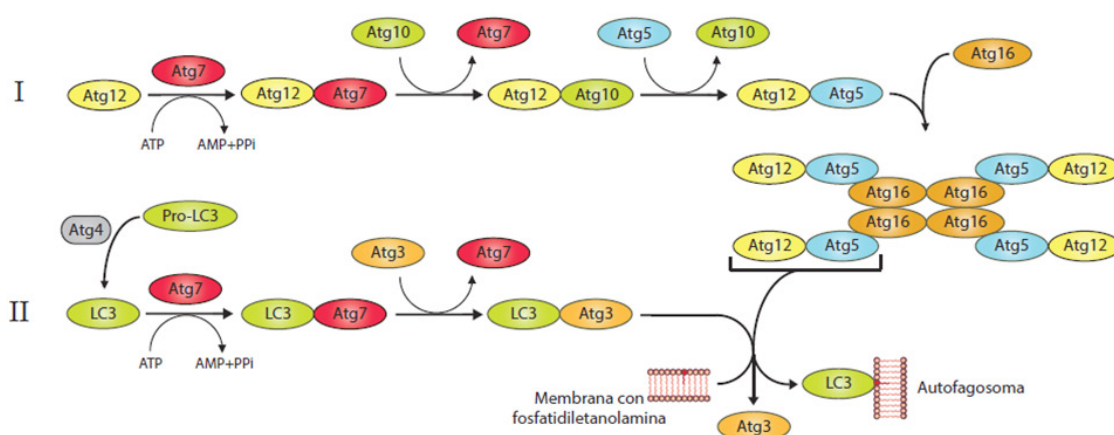


Figura 1.16. Sistemas de conjugación de proteínas Atg. Existen dos sistemas (I y II), en (I) Atg12 funciona como proteína análoga a ubiquitina y es conjugada a Atg7, y posteriormente a Atg10. Atg12 queda conjugada a Atg5, y forma un complejo tetramérico junto con Atg16. En (II), LC3 es conjugado con Atg7, y Atg3. Finalmente, es conjugado con fosfatidiletanolamina, para lo que son necesarias Atg5-Atg12, los cuales presentan actividad E3 ligasa. LC3 conjugado con fosfatidiletanolamina (LC3-II) se localiza en los autófagosomas, y es esencial para la activación de la autofagia. Figura adaptada de Nakatogawa, H. et al. 2009.

Se puede considerar que el proceso de la autofagia consta de varias etapas: 1) Fase de nucleación o ensamblaje; 2) Elongación y formación de las vesículas; 3) Fusión de vesículas (autófagosomas); 4) Degradación del contenido (autófagolisosomas). Para la inducción de la autofagia que lleva a la formación de la vesícula inicial, se identificó un complejo compuesto por las proteínas Atg1-Atg13-Atg17 (en mamíferos ULK1-Atg13-FIP200). Para el proceso inicial de reclutamiento de la membrana del autófagosoma y de sus componentes proteicos, es esencial la participación del complejo de Beclina1 (homólogo de Atg6), hVps15, y hVps34 (PI3K Clase III); éste último, produce fosfatidil-inositol-3-monofosfato [PI(3)P], que pasa a formar parte de la membrana inicial del autófagosoma. A continuación, para la elongación se produce el reclutamiento de otras proteínas Atg, como Atg8 (LC3, proteína de unión a microtúbulos de cadena ligera 3) y Atg12, las cuales funcionan como proteínas de conjugación análogas a ubiquitina. En mamíferos, existen 6 homólogos de Atg8, que se pueden subdividir en la familia de la proteína 1 de la cadena ligera 3 (LC3A, LC3B y LC3C) y la de la proteína asociada al receptor gamma-ácido amino butírico (GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2) (Wild, 2014). Existen dos formas de LC3, LC3-I es la forma no lipidada y que se encuentra libre en el citoplasma; y LC3-II es la forma lipidada (conjugada con fosfatidiletanolamina) esencial para el proceso de la autofagia y localizada en la membrana de los autófagosomas. La conversión de LC3 es un método muy común para la evaluación experimental de la activación del flujo autofágico. Otras proteínas, entre ellas p62/SQSTM1 (secuestrosoma 1), contienen secuencias que interaccionan con LC3 y sirven como adaptadoras entre estructuras proteínas ubiquitinadas y orgánulos dañados y la maquinaria autofágica.

1.4.2.2. Regulación de la autofagia

La autofagia está regulada por una amplia variedad de proteínas y de vías de señalización. En 1995, el grupo de Meijer demostró que la rapamicina (inhibidor de mTOR) es un agente inductor de autofagia en los hepatocitos de rata (Blommaert, 1995). Actualmente, se sabe que la rapamicina es un inhibidor clásico de mTORC1 e inductor de autofagia. La autofagia se activa en situaciones de ayuno o de estrés energético, cuando AMPK está activada (mTORC1 está inhibido) inte-

racciona con ULK1, promoviendo su activación e induciendo la formación del autofagosoma inicial. Por otro lado, la presencia de nutrientes y factores de crecimiento produce la activación de mTORC1, el cual inhibe a la autofagia al actuar secuestrando al complejo implicado en la formación del autofagosoma (ULK1-Atg13-FIP200) e impidiendo su interacción con AMPK (Kim, 2011).

El trabajo de Pattingre y colaboradores demuestra que los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL son moduladores negativos de Beclina1, impidiendo la activación del complejo e inhibiendo la autofagia (Pattingre, 2005).

Son varios los componentes de la maquinaria autofágica que pueden estar regulados por acetilasas/desacetilasas. Por ejemplo, la sirtuina 1 (SIRT1) puede desacetilar Atg5, Atg7 y LC3 para estimular la autofagia (Lee, 2008). Por otro lado, cuando la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) se activa en condiciones de falta de nutrientes, ésta activa una acetil transferasa (TIP60), la cual acetila a ULK1, induciendo la autofagia (Lin, 2012).

Debido a que una autofagia defectiva contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica), se propone a las moléculas activadoras de autofagia o la restricción calórica como potenciales estrategias terapéuticas para atenuar la progresión de dichas enfermedades. Estudios *in vitro* demuestran que el tratamiento con rapamicina, resveratrol o sus análogos son capaces de eliminar los agregados proteicos, incluyendo péptido β -amiloide, Tau, huntingtina, α -sinucleína y priones (Ghavami, 2014).

1.4.2.3. Papel de la autofagia en la célula β pancreática

En la DM 2, se activa el estrés de RE para poder compensar la hiperglucemia, sin embargo, una hiperactivación prolongada de mTORC1 conduce a una autofagia defectiva y desencadena apoptosis a largo plazo (Osowski, 2011). Modelos animales con autofagia deficiente por delección de un gen crítico, *Atg7*, de forma específica en célula β , muestran una disminución de la masa de célula β , así como del reciclaje basal de orgánulos y proteínas, demostrando su papel clave en el mantenimiento de la masa y la función de la célula β (Jung, 2008) (Ebato, 2008). Otros trabajos y resultados previos del grupo demuestran el papel protector de la autofagia en las células β frente a estrés de RE (Bartolomé, 2012), y como la inhibición de autofagia acelera la muerte por agentes que causan estrés de RE (Quan, 2012).

Otros trabajos proponen que una deficiencia de autofagia puede contribuir al aumento de mitocondrias afuncionales y especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando en una acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas (Twig, 2008), lo cual ha sido relacionado con el envejecimiento y con la muerte de las células β , contribuyendo a la resistencia a la insulina (Yen, 2004) (Gonzalez, 2011).

1.4.2.4. Autofagia específica de mitocondrias (mitofagia) y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias juegan un papel esencial en numerosos procesos bioenergéticos en las células eucariotas, proveyendo de energía que se genera a través de la fosforilación oxidativa. Además, son el compartimento en donde tienen lugar reacciones metabólicas tales como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos; y juegan un papel central en la homeostasis del calcio.

Las mitocondrias son orgánulos celulares complejos, con una morfología y distribución intracelular diversa y característica para cada tipo celular. En su estructura presentan una membrana externa (bicapa lipídica) permeable a iones, metabolitos y polipéptidos gracias a la presencia de unos canales aniónicos dependientes de voltaje. A continuación, presentan un espacio intermembranoso, y una membrana interna la cual es más selectiva y forma invaginaciones denominadas también crestas mitocondriales, donde se localizan los complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana. Finalmente, presentan una matriz interna que contiene el ADN y las moléculas que llevan a cabo el metabolismo mitocondrial.

Las mitocondrias constituyen una red interconectada de alta plasticidad y dinámica, con un número relativamente constante de las mismas mantenido por un balance entre eventos opuestos de biogénesis mitocondrial y mitofagia.

La fisión mitocondrial es esencial en la división celular, aumentando en la fase S e inicio de la fase M del ciclo celular (Sanger, 2000). En mamíferos, la fisión está controlada por, entre otras, las actividades de la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1) y la proteína de fisión 1 (Fis1). Drp-1 posee homología de secuencia con las dinaminas, GTPasas que regulan el tráfico vesicular y la endocitosis. Drp-1 de distribución citoplasmática y carece de una secuencia de destino mitocondrial, depende de Fis-1 para su reclutamiento en la membrana mitocondrial. Actualmente, la interacción directa entre ambas proteínas se ha demostrado solo con proteínas recombinantes o en levaduras, en las que la localización mitocondrial de Dnm1p (homólogo de Drp-1) se pierde completamente para Fis1p (homólogo de Fis1) (Yoon, 2003). La fisión mitocondrial también se ha asociado a condiciones de estrés metabólico (Yu, 2006), así como a la autofagia (Twig, 2008) y la apoptosis (Lee Y. , 2004).

El proceso de fisión es compensado con el de fusión mitocondrial. Cuando la fusión predomina, las mitocondrias se tornan altamente interconectadas, formando una red estructurada. Los principales reguladores de la fusión en el humano son las dos isoformas de las proteínas mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) y la proteína de la atrofia óptica (OPA1). Mientras que las Mfn1 y 2 interactúan entre sí para coordinar la fusión de la membrana mitocondrial externa (Chen, 2003), OPA1 se localiza en el espacio intermembrana y asociada a la membrana mitocondrial interna, y participa en el remodelado de las crestas mitocondriales y la fusión de la membrana mitocondrial interna (Olichon, 2002). La fusión de la membrana interna requiere la hidrólisis de GTP, además de depender de un potencial de membrana mitocondrial intacto y, por lo tanto, de una alta síntesis de ATP (Malka, 2005).

Frente a un daño mitocondrial, se pierde el potencial de membrana mitocondrial y se induce el proceso denominado mitofagia. Dado la reciente caracterización de este proceso, el mecanismo molecular es poco conocido. Las mitocondrias dañadas acumulan una proteína en la membrana externa mitocondrial denominada PINK1 (quinasa 1 inducida por PTEN), la cual recluta a una ubiquitina-proteína ligasa E3 citosólica denominada PARK2/Parkin, que media la ubiquitinación de proteínas mitocondriales (como por ejemplo, mitofusina). Estas son reconocidas por otras proteínas adaptadoras (p62 y HDAC6) las cuales unen LC3 unido a PE (forma lipídica), iniciando la degradación (Vives-Bauza, 2011). Este proceso es selectivo, y no ocurre en mitocondrias “sanas”, ya que éstas son capaces de importar PINK1 y degradarlo por la proteasa PARL (proteína romboidea asociada a presenilinas), de una forma dependiente de potencial de membrana, inhibiendo así el proceso de mitofagia (Jin, 2010).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis y objetivos de la primera parte

La acetilación en lisinas es una PTM reversible de las proteínas. La acetilación modula la actividad de un gran número de complejos proteicos e interviene en diferentes procesos biológicos, entre los que podemos destacar la reparación y replicación del DNA, ciclo celular, transcripción de RNA, transporte nuclear y remodelado de la cromatina (Choudhary, C., 2010). Sin embargo, el estudio del acetiloma es bastante reciente, por ello, es necesario profundizar en el conocimiento del efecto de dicha PTM sobre la actividad de las proteínas. En los últimos años nuestro grupo está centrado en el estudio de la vía de señalización de TSC2/mTORC1/p70S6K, y en el papel que presenta en la regulación de la proliferación, autofagia y estrés de retículo de la célula β pancreática. El objetivo principal de esta primera parte es contribuir al conocimiento de nuevos moduladores de la vía TSC2/mTORC1 *in vitro*, para profundizar en los mecanismos moleculares que gobiernan la actividad de esta ruta, y posteriormente, trasladarlos a un contexto de pacientes con diabetes tipo 2.

El complejo TSC1-TSC2 funciona como un nexo integrador de la señalización energética y de factores de crecimiento. Se encuentra altamente regulado por fosforilaciones provenientes de otras proteínas, sin embargo, se desconoce la modulación de la actividad y estabilidad mediada por acetilación en las lisinas de este complejo. La primera evidencia fue el trabajo de Ghosh (Ghosh, H.S., 2010), el cual determina que TSC2 interacciona con SIRT1, modulando la vía de señalización de mTORC1. Utilizando diferentes líneas celulares (MEF y HEK 293T), así como una línea de célula β pancreática (MIN6), decidimos abordar los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de diferentes moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1 (NAM y RESV) sobre la modulación de TSC2/mTORC1, autofagia y proliferación.
- Identificar lisinas susceptibles de acetilación de TSC2.
- Determinar nuevas proteínas de interacción de TSC2.

2.2. Hipótesis y objetivos de la segunda parte

La autofagia es un proceso fisiológico de eliminación de proteínas mal plegadas o disfuncionales y orgánulos dañados, alternativo al sistema ubiquitin-proteasoma. La autofagia tiene como principales funciones la obtención de ATP, control de calidad citoplasmático y defensa frente a infecciones. Este proceso es regulado negativamente por mTORC1. Previamente, trabajos de nuestro grupo han demostrado el papel protector de la autofagia frente a estrés de RE, *in vitro* e *in vivo* (Bartolomé, A., 2012) (Bartolomé, A., 2014). Asimismo, hay evidencias recientes que apuntan a que la hiperactivación de mTORC1 causada por una delección de TSC2, contribuye a un desbalance en la homeostasis mitocondrial, mediada por un impedimento en la activación de la autofagia y en la eliminación específica de mitocondrias (mitofagia) (Bartolomé, A., 2014) (Taneike, M., 2016). El objetivo primordial de esta segunda parte es analizar el papel de la vía de

TSC2/mTORC1 en la regulación de la autofagia y mitofagia. Mediante el uso de líneas celulares MEF *Tsc2* +/+ y *Tsc2* -/-, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Profundizar en los mecanismos moleculares y las causas de la alteración del flujo autofágico y mitofágico presente en la hiperactivación de mTORC1 causada por la delección de TSC2. Para ello, nos planteamos el uso del desacoplante del potencial de membrana mitocondrial CCCP.
- Analizar los efectos de la rapamicina in vitro para corroborar los datos in vivo observados en el animal $\beta Tsc2$ -/-.
- El estudio del papel de TSC2 per se en la regulación de la mitofagia.

3 MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Todos los medios de cultivo y suplementos fueron obtenidos de Life Technologies, salvo excepciones indicadas. Todos los medios fueron suplementados con antibióticos: penicilina G (12 µg/ml), estreptomycin (10 µg/ml), anfotericina B (0,25 µg/ml) y MycoZap (Lonza, Basilea, Suiza).

Se usó la línea de células β pancreáticas MIN6 originaria de insulinoma murino (Miyazaki et al., 1990), cultivada en DMEM (glucosa 4,5 g/l) y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% y 2-mercaptoetanol 50 µM (como agente protector frente al daño oxidativo). Además, a partir de ésta, se generaron otras dos líneas de forma estable MIN6-*Scrambled-shRNA* y MIN6-*TSC2shRNA* mediante infección lentiviral y selección con geneticina.

También, fueron usadas las células embrionarias de riñón humanas (HEK 293T) y fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), cultivados en DMEM (4,5 g/l) y suplementados con FBS 10% y HEPES. Las células MEF *Tsc2* -/- así como sus controles MEF *Tsc2* +/+ fueron generosamente proporcionadas por Dr. Kwiatkowski (Harvard Medical School, Boston, EE.UU.). Por último, las células MEF *Sirt1* -/- así como sus controles MEF *Sirt1* +/+ procedían del cultivo primario y fueron generosamente proporcionadas por la Dra. María Monsalve (IIB, CSIC, Madrid).

3.1.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación

Condiciones de cultivo

Las células fueron cultivadas en placas de poliestireno tratado para cultivo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) y mantenidas en incubador a 37°C en una atmósfera controlada con alta humedad y CO₂ al 5%. Las células fueron subcultivadas tras lavado con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) e incubación con una solución de tripsina 0.25% y EDTA 0,02% en PBS. La tripsina permite levantar a las células adherentes de la placa al digerir proteínas que mantienen a las células unidas entre sí y a la placa. La digestión se paró mediante la adición de medio completo. El subcultivo se realizó entre una y dos veces a la semana dependiendo de la línea celular.

Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares

Para el mantenimiento de un stock celular, las células se tripsinizaron y una vez parada la reacción, se centrifugaron a temperatura ambiente (t.a.) (a 2000 rpm durante 5 minutos). Una vez finalizada la centrifugación, el precipitado se resuspendió en medio de congelación (FBS filtrado con 10% de DMSO), y la solución (alrededor de 1 ml) se guardó en criotubos debidamente etiquetados. El proceso de congelación fue llevado a cabo enfriando desde t.a. hasta -80°C a un ritmo de -1°C/min. Para ello, los criotubos se colocaron sobre un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Scientific) que fue introducido en un congelador a -80°C. Las células así congeladas pudieron mantenerse a -80°C durante meses. Para periodos más largos los criotubos fueron llevados a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C). La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los viales directamente de -80°C o nitrógeno líquido a un baño a 37°C, con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo.

Condiciones de experimentación

Por lo general, las células fueron sembradas el día anterior al comienzo del experimento. Los estímulos fueron realizados en medio completo (alto en glucosa y FBS), salvo indicación, un día después de la siembra del experimento.

Micoplasma y tratamiento de las células contaminadas

La contaminación de cultivos celulares con micoplasma sigue siendo uno de los mayores problemas encontrados en investigación biológica. Esta contaminación puede producir grandes cambios en los cultivos que infecta y muchas veces no es detectable a simple vista (Russell et al., 1975). Por ello, todas las líneas fueron ensayadas para presencia de micoplasma tras su descongelación, y de forma rutinaria 1-2 veces al mes, mediante dos técnicas diferentes.

Por un lado, se realizó un ensayo citoquímico, las diferentes líneas celulares en marcha fueron sembradas en placas de 12 pocillos, y 2 días más tarde lavadas con una solución de DAPI 1 µg/ml (4',6'-diamidino-2-fenilindol) en metanol e incubadas con esta misma solución 15 min a 37°C. Seguidamente, fueron lavadas una vez con PBS para la observación directa en un microscopio invertido de fluorescencia. DAPI se une selectivamente al ADN, dando lugar a núcleos altamente marcados y citoplasma no detectable. Los complejos DAPI-ADN tienen absorbancia máxima a 340 nm (excitación con luz UV) y emisión máxima a 488 nm (azul). En el caso de contaminación con micoplasma se observarían focos de fluorescencia característica en el citoplasma y a veces en espacios intercelulares.

Otro método alternativo fue la detección por PCR del sobrenadante del medio de las células cultivado durante mínimo 48 horas, con *primers* específicos de *Mycoplasma sp.*

(S: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'; AS: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3').

Para la eliminación eficaz de micoplasma presente en las células en cultivo, las células infectadas con *Mycoplasma sp.* Fueron tratadas con BM Cyclin (Roche) según las instrucciones del fabricante.

3.2. Técnicas de ADN recombinante

3.2.1. Cultivo de bacterias

Transformación de bacterias

Para la producción de ADN plasmídico recombinante se utilizaron bacterias ultracompetentes *E. coli* XL2-Blue (Agilent Technologies #200150 y Fisher 12715670). Todos los plásmidos fueron amplificados muy eficientemente, según las instrucciones del fabricante. 50 µl de bacterias enriquecidas con 2-mercaptoetanol 25 mM fueron transformadas con 1 µl de ADN (0.1-50 ng), mediante un pulso de calor a 42°C.

Cultivo en placas de agar-LB

Las bacterias fueron crecidas en placas Petri con agar bacteriológico 1.5% (p/v) en medio LB, Luria Bertoni: NaCl (10 g/l), triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l). El medio fue autoclavado, y enfriado hasta 55°C para la adición de antibióticos: ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml). Entre 20-25 ml fueron vertidos por placa Petri, sobre la cual, una vez solidificado el medio, se sembraron las bacterias por estrías con un asa de Kolle. Se dejaron crecer no más de 15 h, con el fin de evitar la aparición de colonias satélite en las placas de agar con ampicilina/kanamicina. Se trabajó en condiciones asépticas, en la proximidad de un mechero Bunsen, utilizado para esterilizar el asa de Kolle.

Cultivo en LB líquido

Todas las inoculaciones para amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar con antibiótico. Se inocularon primeramente en un volumen de 2-3 ml de LB con antibiótico (miniprep), crecidas en incubador a 37°C en tubos de polipropileno no cerrados herméticamente para permitir el intercambio de gases, con agitación vigorosa (~250 rpm) hasta saturación del cultivo (10-15 h). La miniprep fue pasada directamente a un volumen de 100-200 ml de LB con antibiótico (maxiprep), y cultivado en agitación durante 15 h. De esta manera, se obtuvo una masa de bacterias aproximada de 0,3 g/100 ml.

Congelación en glicerol stock.

El medio LB conteniendo las diferentes bacterias transformadas expresando las construcciones de interés fueron mantenidas indefinidamente tras mezclar 500 µl de medio LB con 500 µl de una solución estéril de glicerol 50% (v/v). Los glicerol-stock fueron criopreservados a -80°C. Para recuperar las construcciones se raspó la superficie del glicerol-stock con un asa de Kolle (sin llegar a descongelarlo para ello), y se sembró en placas de agar.

3.2.2. Purificación de plásmidos y transformación de bacterias

Los plásmidos fueron purificados de cultivos bacterianos por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para ello, se utilizó el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando las soluciones incluidas para obtener de una forma rápida y sencilla y con un alto rendimiento un DNA de gran calidad. Los plásmidos fueron resuspendidos en un tampón de resuspensión P1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) en presencia de ARNasa A (100 µg/ml). A continuación, las bacterias se lisaron con el tampón alcalino de lisis P2 [NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v)]. El SDS solubiliza los fosfolípidos y los componentes proteicos de la membrana celular, liberando el contenido celular. La lisis alcalina se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH, en condiciones en las que el DNA plasmídico permanece próximo a su estructura nativa, debido principalmente a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada. Luego se añade un tampón de neutralización P3 (acetato potásico 3M pH 5.5). Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de sal, se produce la precipitación de gran parte de las proteínas desnaturalizadas, así como del DNA cromosómico. Tras una primera centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos (Centrífuga Sorvall), se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 15 minutos más. Durante esta segunda centrifugación,

se procede a equilibrar la columna de Quiagen-tip 500 con el tampón de equilibrado QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), 0.15% Triton X-100 (v/v), pH 7.0). Tras la segunda centrifugación, se cargó el sobrenadante en la columna. El DNA se queda retenido en la columna de resina, mientras que el resto de componentes (RNA, proteínas, etc) se eluyen tras el lavado con el tampón de lavado QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), pH 7.0). A continuación, se eluye el DNA con un tampón precalentado a 42°C y de una elevada concentración de sales (QF: NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), pH 8.5).

Seguidamente, se precipitó el DNA plasmídico eluido, al mismo tiempo que se eliminaron las sales contenidas en él, tras la adición de isopropanol a t.a., el cual permite la precipitación del DNA. Se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y el precipitado se lava con etanol al 70%, que es más volátil y fácilmente eliminado en comparación con el isopropanol. Finalmente, el DNA purificado se deja secar al aire libre durante 5-10 minutos para que se evapore el etanol, y se resuspende en agua destilada, donde se mantiene a 4°C de manera estable hasta su uso.

3.2.3. Trabajo con enzimas de restricción

Para comprobar la correcta identidad de los plásmidos amplificados se usaron diferentes enzimas de restricción obtenidas de Promega, Fitchburg, EE.UU (*NotI*), de Roche (*Sall*), o de Fermentas, Vilna, Lituania (*BamHI*), según las instrucciones del fabricante (diluido en tampón y agua). A continuación, se incubó 2 horas a 37°C y 5 minutos a 80 °C. Finalmente, se corrió un gel de agarosa al 0,8%, y se comprobaron los diferentes tamaños de los plásmidos usados con DNA sin digerir y digerido con la/s enzima/s de digestión (plásmido linearizado) mediante el uso de un transiluminador UV (alta longitud de onda).

3.2.4.. Producción de partículas retrovirales e infección celular

Para la generación de células MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-} que expresan de manera estable GFP-LC3B, se transfectaron las células empaquetadoras Phoenix con el vector pBABE-puro-GFP-LC3B (Addgene, #11546) mediante el método de lipofección (Lipofectamina 2000, Invitrogen, 11668-019). Transcurridas 48 horas tras la transfección, se recogieron los sobrenadantes que contenían las partículas retrovirales, y se pasaron a través de filtros de 0.45 µm. Las células MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-} fueron infectadas con aproximadamente 1 ml de sobrenadante (por placa de 60 mm) que contiene las partículas retrovirales y 2 ml de medio enriquecido con polibreno 8 µg/ml (Sigma-Aldrich) durante 4 horas, completado con 5 ml con medio completo sin antibióticos durante las siguientes 72 horas. Tras los tres días de la infección, se procedió a la selección con geneticina (250 µg/ml) durante 3 semanas. Las células fueron subclonadas por el método de dilución límite.

De manera similar, se siguió el mismo método para la immortalización de las células MEF *SIRT1*^{+/+} y *SIRT1*^{-/-}. Se infectaron dichas células con las partículas retrovirales pBABE-puro SV40 LT (Addgene, #13970), y se seleccionaron con puromicina (1 µg/ml).

3.2.5. Experimentos de transfección y co-transfección transitoria.

Las células HEK 293T, MIN6 y MEF *TSC2*^{-/-} fueron sembradas de manera semi-confluente, y al día siguiente fueron transitoriamente transfectadas y/o co-transfectadas con diferentes plásmidos usando tres métodos diferentes:

- Lipofección con Lipofectamina 2000.
- Electroporación con TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Mirus).
- Poliaminas: Polietilenimina “Max” (Peso molecular 40.000), linear (25.000) de Polyscience (#23966). Concentración de uso PEI 1mg/ml, en una proporción DNA:PEI 1:3 (p/p) y 150 µl de Opti-MEM.

Dependiendo de la línea celular, se añadieron diferentes cantidades de DNA plasmídico, desde 0,5 µg para las HEK (se transfectan muy fácilmente), hasta 8-12 µg para las MEF *TSC2*^{-/-} en placas de 60 mm.

Al día siguiente de la transfección, se cambió el medio por medio fresco, y transcurridas otras 24 horas, se estimularon con los agonistas correspondientes.

3.3. Ensayos de expresión génica

3.3.1. Extracción de ARN total de las células en cultivo

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, y fueron colocadas sobre hielo donde se añadió en campana 500 µl de Trizol (Life Technologies) para el aislamiento de ARN de las células. Se homogeniza bien con la pipeta para destruir las células y disolver los componentes celulares, que se recogen en un *epENDORF*. A continuación, se añaden 200 µl de cloroformo y se agita con un vortex durante 15 segundos. Transcurrido este tiempo, se dejan reposar las muestras durante 10 minutos en hielo, y tras una posterior centrifugación (12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos), se observa una clara separación en tres fases: una clara capa acuosa superior (que contiene ARN), una capa de interfase blanquecina (que contiene ADN y proteínas) y una orgánica rosa. Se recoge el sobrenadante y se añaden 700 µl de isopropanol, y se mantiene en frío (-20°C) durante 1 hora para que precipite el ARN. Una vez haya pasado este tiempo se retira el sobrenadante con una pipeta, y el precipitado restante se lava con etanol frío al 80%. Posteriormente, se centrifugan las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos, y una vez finalizada la centrifugación, se aspira el sobrenadante y se dejan secar los precipitados durante 10 minutos. Finalmente, se resuspenden en 10 µl de agua destilada para su posterior medida de absorbancia (260 nm en un espectrofotómetro) y cálculo de su concentración.

3.3.2. Valoración de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos se valora por una lectura espectrofotométrica doble a 260 y 280 nm en cubeta de cuarzo. A 260 nm, los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción, mientras que a 280 nm presentan un máximo los aminoácidos aromáticos de proteínas. El ratio A260/A280 da una idea del grado de contaminación de las muestras con proteínas, y en condiciones óptimas debe situarse entre 1.8 y 2. Para valorar el contenido de los ácidos nucleicos, hay que tener en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde a 20 µg/ml de oligonucleótidos, 40 µg/ml para ARN de cadena sencilla y a 50 µg/ml para ADN de cadena doble.

3.3.3. Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción

Con el fin de eliminar posibles contaminaciones de DNA en las preparaciones de RNA, que posteriormente pudieran interferir en la reacción en cadena de la polimerasa, las muestras de RNA total aisladas de las diferentes muestras se tratan con la enzima DNasa I recombinante libre de RNasas (Roche). La DNasa I es una endonucleasa específica de ADN que hidroliza los enlaces fosfodiéster entre el DNA y oligo o mononucleótidos. En todos los experimentos se incubaron 5 µg de RNA con:

- 10 unidades de DNasa I
- 20 unidades de RNasin, inhibidor de RNasas (Promega)
- Buffer 10x (2 µl) que contiene cationes divalentes para la máxima actividad de la enzima (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.9).

La mezcla se completó con agua libre de RNasas hasta 20 µl y se incubaron todas las muestras a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción es parada con una fase final a 95°C durante 5 minutos para inactivar la ADNasa.

A continuación, se procedió a la síntesis del ADNc. Para ello, la solución restante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) utilizando *primers* aleatorios y una retrotranscriptasa y un inhibidor de RNasa, según las instrucciones del fabricante. La solución se incubó a 37°C durante dos horas, seguido de una inactivación de la enzima (5 minutos a 95°C).

3.3.4. PCR cuantitativa

El contenido de ADNc obtenido a partir del ARN de las células fue usado para análisis por PCR usando Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un ABI Prism 7900 (Life Technologies), con sondas TaqMan (Applied Biosystems) o cebadores específicos. La sonda para el ARNm de Pink1 (Taqman Applied Mm00550827_m1) fue cedida generosamente por Patricia Boya. Las secuencias de los cebadores para el análisis del ARNm de *PGC1α* y *PGC1β* fueron:

PGC1α (S:5'-AATCAGACCTGACACAACGC-3'; AS:5'-GCATTCCTCAATTCACCAA-3')

PGC1β (S:5'-CGCTCCAGGAGACTGAATCCAG-3'; AS:5'-TTGACTACTGTCTGTGAGGC-3').

La abundancia relativa de los ARNm fue calculada usando el método de ΔC_t y normalizados con el ARNm del control invariable, la β -actina. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

3.4 Análisis de la expresión de proteínas

3.4.1 Western-Blot

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con tampón de lisis [Nonidet-P40 1% (v/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, pH 7.5] y añadidos extemporáneamente PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 2 µg/ml. El lisado se pasó a tubos eppendorf y tras 5-10 minutos en hielo y tras agitación fueron centrifugados (15 min, 15,000 × g, 4°C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico, y se descartaron los restos celulares del precipitado.

A continuación, se valoraron las proteínas por el método de Bradford. Como control, se prepara una curva de calibrado de 0-10 µg/ml a partir de una solución estándar de BSA de 2 mg/ml (Bio-Rad). Para el ensayo se cuantifica la absorbancia de una mezcla de 1 µl de la muestra a analizar en 1 ml de la solución de Bradford (Bio-Rad) diluida en ddH₂O (1:5), y cuantificada su absorción en espectrofotómetro a 595 nm.

Se igualó la concentración de las muestras a 0.5-2 µg/µl de proteína, preparando un volumen determinado y diluyendo con tampón de lisis, además se completan con tampón de Laemmli concentrado (Laemmli, 1970) para una concentración final [Tris-HCl 100 mM, glicerol 5% (v/v), SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,004% (p/v), pH 6.8]. Las muestras son desnaturalizadas (3 min, 95°C) y cargados 15-30 µg por muestra en geles de poli-acrilamida. Junto a las muestras, se usó un estándar de marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad).

Los geles contienen además de poli-acrilamida, SDS que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8.8 para el gel separador; pH 6.8 para el concentrante, persulfato amónico y TEMED que catalizan la polimerización del gel. Las proporciones de los diferentes componentes varían según el tipo de gel. Junto a las muestras, se usó un estándar de marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad).

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1% (p/v) pH 8.3, a un voltaje constante de 100-140 v durante 1.5-2 horas. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) previamente activadas con metanol.

El gel se colocó pegado a la membrana de PVDF y el conjunto entre 2 capas de papel Whatman, colocado todo el sistema entre almohadillas y una carcasa, de tal forma que las proteínas migraran hacia el polo positivo. El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicina, metanol 20% (v/v). La electrotransferencia fue llevada a cabo con el Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), con un voltaje constante de 100 v, durante una hora y diez y en frío.

Finalizada la transferencia, se bloquearon las membranas en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) más Tween-20 0,05% (v/v), TTBS; suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Este paso tiene como finalidad bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario a proteínas.

Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS (salvo indicación) hasta el día siguiente, en una cámara fría a 4°C, con agitación suave. La lista con todos los anticuerpos primarios y sus diluciones se encuentra en la sección materiales (Tabla 2).

Al día siguiente, la membrana se lavó 3-5 veces con TTBS durante una hora en agitación fuerte, tras la cual se incubó con una solución en TTBS de anticuerpo secundario frente a la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 h a temperatura ambiente en agitación suave.

Finalmente, se volvió a lavar con TTBS otras 3-5 veces durante aproximadamente una hora, en agitación fuerte.

Para la detección de los anticuerpos se usó el método de quimioluminiscencia, el cual se basa en la oxidación del luminol a 3-aminofthalato (en presencia de H₂O₂ y un catalizador), el cual decae a su estado fundamental emitiendo luz visible (432 nm). Las membranas se incubaron con ECL Plus Western Blotting Detection (GE healthcare) durante 5 minutos, y se revelaron en el ChemiDoc por detección de quimioluminiscencia.

3.4.2 Inmunoprecipitación

De los extractos proteicos de cultivos celulares se preparan muestras con una cantidad de proteína uniforme (150-400 µg de proteína) en un volumen final de 500 µl ajustado con tampón de lisis, se añadió el anticuerpo de interés para inmunoprecipitar (1-2 µg de anticuerpo), y se mantuvo toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente, para quedarse con toda la proteína que se ha unido al anticuerpo, se añadió el extracto proteico 20-30 µl de una mezcla de proteína A (si el anticuerpo primario está generado en conejo) o G (si el anticuerpo primario se ha generado en ratón) al 50% (Roche) con tampón de lisis (1:1, previamente lavada varias veces con el tampón) y se incubaron de 1 a 2 horas a 4°C. La proteína A/G se une a la fracción constante de las IgG y, al estar la proteína A o G conjugada con agarosa, sedimentan rápidamente por centrifugación y se pueden separar del resto del sobrenadante, que contiene las proteínas que no han sido reconocidas por el anticuerpo usado en la inmunoprecipitación.

La fase sedimentada (con la proteína A o G conjugada con la agarosa) se lavó varias veces con 500 µl de tampón de lisis, dejando en un último paso el precipitado lo más seco posible. Después, se añadió el mismo volumen de tampón de Laemmli 2X que el ocupado por la fracción de agarosa. Las muestras ya preparadas se hierven 5 min a 95°C para eliminar las uniones entre proteínas, y se cargan en geles de electroforesis para su detección por *western-blot*.

El sobrenadante contiene todas las proteínas excepto la proteína frente la cual se ha inmunoprecipitado y otras que se encuentran interaccionando con la misma. Así, se puede recoger el primer sobrenadante obtenido tras la centrifugación, posterior a la incubación con el anticuerpo primario, para la detección del resto de proteínas del extracto por *western-blot*.

3.4.3 Análisis de la estabilidad de la proteína TSC2

Para el ensayo de la estabilidad de TSC2, se sembraron las células, y al día siguiente se sometieron a un pretratamiento con cicloheximida (100 µg/ml) durante 30 minutos, y a continuación, se estimularon con nicotinamida o resveratrol. La cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas, por lo que el análisis por *western-blot* de los niveles de TSC2, permite analizar la vida media de dicha proteína.

3.4.4 Aislamiento de mitocondrias para la detección de proteínas oxidadas y nitradas

Para la detección de proteínas oxidadas en mitocondrias, se utilizaron alrededor de 2×10^7 células por punto. Las células fueron tripsinizadas, centrifugadas (3 min, 2.000 rpm, 4°C) y lavadas con PBS. Para la purificación de mitocondrias se utilizó el Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, pero adaptadas al procedimiento subsiguiente. Para ello todos los tampones fueron suplementados con 2-mercaptoetanol 1% (v/v) para evitar la oxidación de proteínas tras la lisis celular, y para reducir al máximo la contaminación con peroxisomas y lisosomas, el precipitado de mitocondrias se obtuvo centrifugando (15 min, 5.000 rpm, 4°C), en vez de 13000 rpm (obteniendo un menor rendimiento pero mucha menor contaminación de otros orgánulos). Una vez obtenido y lavado el precipitado mitocondrial, fue resuspendido en 30 μ l de tampón de lisis TBS-CHAPS [CHAPS 2% (p/v), Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 2-mercaptoetanol 1% (v/v), pH 7.5]. Se utilizaron 5 μ l para la cuantificación de proteínas, y el resto para derivación de proteínas o *western-blot* directo. Para la derivación de proteínas, aproximadamente 10 μ g de proteína mitocondrial en un volumen de hasta 10 μ l fueron derivadas usando el kit OxyBlot para detección de proteínas oxidadas (Merck Millipore). Esta técnica se basa en la detección de grupos carbonilo introducidos en las cadenas laterales de proteínas cuando estas se encuentran sometidas a estrés oxidativo. Los grupos carbonilos sufren una reacción de condensación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP-hidrazina), y el uso de un anticuerpo específico frente a DNP permite la cuantificación por *western-blot* de las proteínas oxidadas. Para la detección de proteínas nitradas se usó el anticuerpo anti-Nitro tirosina, que detecta residuos de tirosina nitrados en las proteínas.

3.4.5 Métodos de purificación de la proteína TSC2 (Azul de Coomassie y cromatografía de afinidad)

Con el fin de aislar y purificar la proteína TSC2 para la identificación de sus residuos de acetilación mediante espectrometría de masas, se emplearon diferentes aproximaciones:

Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

La tinción de geles con azul de *Coomassie* es una técnica sencilla, sin embargo, tiene un límite de detección de 1mg de proteína por punto. Por ello, se sembraron 3 platos de 100 mm de diámetro por condición (Control y Nicotinamida), para poder inmunoprecipitar 1 miligramo de muestra con el anticuerpo anti-TSC2 (N-19). Se cargó la muestra en un gel de 8% poliacrilamida (de 0,75 mm de ancho). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó durante toda la noche con el reactivo Coomassie *Brilliant Blue* (0,025%) en disolución con metanol (40%) y acético (7%). El Coomassie *Brilliant Blue* es un pigmento del tipo trifenilmetano aniónico, que se une de forma no covalente a los residuos de lisina de las proteínas, y es compatible con la mayoría de métodos de análisis incluyendo espectrometría de masas. Las proteínas del gel se fijan gracias al ácido acético y al mismo tiempo se tiñen. El colorante en exceso que se incorpora en el gel se puede eliminar destiñendo con una disolución de composición idéntica excepto por el colorante. Las proteínas se detectan como bandas azules contra un fondo claro (ver anexo I). A continuación, se llevó al servicio de proteómica para su estudio por espectrometría de masas.

Purificación de TSC2 mediante una columna de cromatografía de afinidad

Se realizó otra aproximación, siguiendo los mismos pasos, pero en este caso se usó para purificar la proteína TSC2 el V5 tagged Protein Purification Kit (Medical&Biological Laboratories, MBL) siguiendo las instrucciones del fabricante. El método de esta técnica se detalla en la imagen. Básicamente, se trata de una separación proteica del extracto total basado en la afinidad de la proteína a purificar (V5) y unas partículas que tienen unida la proteína V5. Tras dicha separación, se procede a eluir la proteína con una solución concentrada en V5, la cual desplaza la unión de dicha proteína con la columna. El volumen eluido se llevó al servicio de proteómica para su estudio.

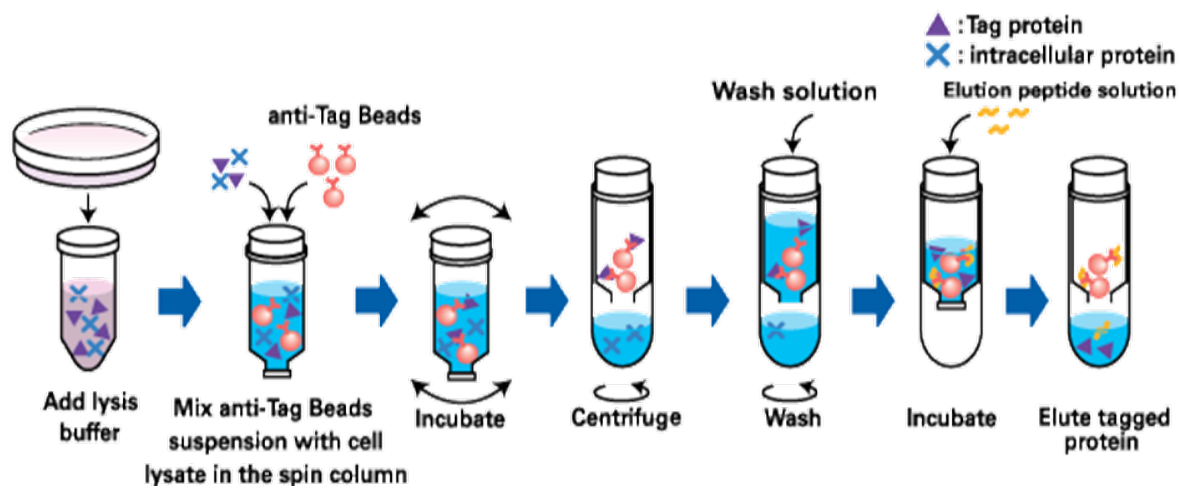


Figura 3.1. Método de purificación de V5 (TSC2) mediante cromatografía de afinidad en columna. Esquema del protocolo del V5 tagged Protein Purification Kit (MBL).

3.5 Técnicas de imagen

3.5.1 Inmunofluorescencia de células en cultivo.

Las células se sembraron sobre cristales de 1 cm de diámetro. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas inmediatamente con una solución de paraformaldehído al 4% (p/v), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con PBS, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente con Tritón X-100 0,2% (v/v) en PBS, con el fin de permeabilizar las células y permitir el marcaje de antígenos intracelulares. Tras esta permeabilización, se lavan y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente con una solución de NH₄Cl (50 mM), con esto se consigue amortiguar la autofluorescencia endógena que presentan las células. Tras un nuevo lavado, se bloquea con una solución de BSA 1% (p/v), 0,2% Tritón X-100 (v/v) en PBT, que consiste en PBS suplementado con Tween-20 0,05% (p/v) durante 45 minutos a temperatura ambiente (en ocasiones enriquecido con 2% de suero de cabra). La incubación con anticuerpos primarios (uno solo o una mezcla de dos anticuerpos para doble marcaje) se realizó durante 1.5 h en cámara húmeda. A continuación, se lava con PBT, y se incubaba con anticuerpo secundario durante 45 minutos (dos veces en el caso de doble marcaje). Tras un último lavado con PBT, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con un líquido de montaje SlowFade Gold (Life Technologies) conteniendo DAPI para la visualización de núcleos. Las muestras fueron observadas generalmente al día siguiente.

3.5.2 Microscopia confocal

Se utilizó un microscopio confocal Axio Observer.Z1 con el módulo de escaneo LSM 700 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se dispuso de 4 láseres de estado sólido (Diodo 405 nm, 5 mW; diodo 488 nm, 10 mW; diodo 555 nm, 10 mW; diodo 639, 5 mW), utilizados por lo general a $\leq 2\%$ de transmisión. Los fluoróforos utilizados en microscopia confocal fueron los siguientes:

- DAPI: siempre fue visualizado en un canal aparte con el láser de 405 nm y un filtro de paso bajo (SP 550 nm), ningún otro fluoróforo utilizado es excitado a 405 nm.
- FITC/EGFP (filtro de emisión del láser a 488 nm).
- MTR Orange/Cy3 (láser a 555 nm).

Todas las imágenes fueron obtenidas en formato de 1024×1024 píxeles, a una velocidad de 0,5-5 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ (dependiendo del experimento). El *pinhole* del microscopio que permite la toma de imágenes confocales fue de un tamaño de aproximadamente 1 *airy unit*, o algo mayor dependiendo del experimento. Las imágenes a lo largo del eje z (z-stacks) fueron recogidas en espacios de 2.5 μm (objetivo 40 \times), y de 1 μm (objetivo 63 \times). Para la operación del microscopio y la obtención de imágenes se utilizó el software ZEN2011 (Zeiss).

3.5.3 Ensayo de Mitotimer

Se generaron células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- que expresan de manera estable un transactivador (rtTA3), que se une y transactiva la expresión génica en presencia de doxiciclina. Los lentivirus se produjeron usando células HEK293T. Fueron sembradas aproximadamente 7×10^5 células por placa de 60 mm. Al día siguiente, se transfectaron por lipofección usando pLenti CMV rtTA3 Blast (Addgene, #26429). Tras 15 horas, se cambió el medio por uno fresco y se recogió el sobrenadante con partículas virales a las 24 h y 48 h siguientes, pasándolo por filtros de 0.45 μm para eliminar cualquier célula que hubiese podido quedar suspendida. El sobrenadante (con los lentivirus) se añadió a las células MEF TSC2+/+ y TSC2-/-, o fueron conservados a -80°C , hasta su uso. Las células fueron seleccionadas con blasticidina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 2 semanas, y transcurrido este tiempo, fueron transfectadas con pTRE-Tight-MitoTimer (Addgene, #50547) con el método de la Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher, L3000015). Al día siguiente de la transfección, las células fueron estimuladas con doxiciclina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 hora, y después de este tiempo, fueron muy bien lavadas con el medio completo. Transcurrido el tiempo de 12 y 24 horas, las células fueron fijadas, y se recogieron imágenes por microscopia confocal. Estas imágenes fueron procesadas con el programa Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Por condición se cuantificaron 20 células, de tres experimentos diferentes.

3.6 Otras técnicas

3.6.1 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

Una vez realizado el tratamiento deseado en cultivo, se levantaron las células con tripsina, y tras parar la reacción con medio con suero, se centrifugaron las células (5 min, 2000 rpm) dos veces tras lavarlas con PBS. El precipitado celular se resuspendió en 300 µl de PBS frío más 700 µl de etanol absoluto a -20°C, en estas condiciones se agitaron las muestras y se dejaron en hielo durante 1 minuto, y las células fueron lavadas dos veces con PBS frío. Se resuspendieron finalmente en 500 µl de PBS atemperado y así fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con ARNasa A (1 mg/ml, Boehringer-Mannheim). El último paso fue añadir 25 µl de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) 0,1% (p/v) en PBS. El yoduro de propidio (IP) es un fluorocromo intercalante de ácidos nucleicos no permeable, por lo que requiere permeabilización. Se valoró el contenido celular de ADN por incorporación de yoduro de propidio (emisión fluorescente entre 568-588 nm), ya que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de la célula, pudiendo diferenciarse células apoptóticas (<2n), células en fase G0/G1, y células en proliferación (fase S/G2-M, >2n). Para ello, se utilizó un citómetro FACScalibur y el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

3.6.2 Ensayo de proliferación por cristal violeta.

Se sembraron las células en placas de 12 pocillos a una densidad de 20000 células/cm² y con un medio bajo en suero (2% FBS). Tras el tratamiento deseado, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con cristal violeta 0,2% (p/v) en 2% etanol (v/v) durante 10 min. Seguidamente, las placas fueron lavadas varias veces con ddH₂O y se dejaron secar. Para cuantificar la cantidad de colorante fijado se añadió 1 ml de SDS 1% (p/v) por pocillo y se midió la absorbancia de cada uno de los puntos a 560 nm. Se utilizó un lector de placas FluoStar Omega (Bmg Labtech, Ortenberg, Alemania).

3.6.3 Predicción de posibles sitios de acetilación y/o desacetilación en lisinas de TSC2 empleando programas in silico

Con el objetivo de detectar posibles lisinas de TSC2 candidatas de ser controladas por acetilación/desacetilación, usamos diferentes programas de predicción de acetilación:

- Musite (<http://musite.sourceforge.net/>). Con este programa se observó que las tan- to las lisinas 599 y 106 eran unas buenas candidatas de ser acetiladas (con una elevada puntuación, 75.10% y 61.73% respectivamente) (Gao, 2010).

```

>gi|269849475|sp|P49815.2|TSC2_HUMAN RecName: Full=Tuberin; AltName:
Full=Tuberous sclerosis 2 protein
125      K      GERLGVLRALFFKVIKDYP SNEDLH 0.53      97.78%
1739     K      HSRSNPTDIYPSKWIARLRHIKRLR 0.47      97.30%
1111     K      GVHVRQTKEAPAKLESQAGQQVSRG 0.38      96.35%
914      K      LPFRKDFVPFITKGLRSNVLLSFDD 0.21      93.32%
533      K      THHFNSLLDIIEKVMARSLSPPEL 0.06      89.16%
351      K      VLSITRLIKKYRKELQVVAWDILLN 0.06      89.16%
144      K      SNEDLHERLEVFKALTDNGRHITYL -0.01      87.11%
3        K      *****MAKPTSKDSGLKEKF -0.03      86.41%
1165     K      ATSPGPRTAPAAKPEKASAGTRVPV -0.06      85.17%
1404     K      QTLQDILGDPGDKADVGRLSPEVKA -0.06      84.96%
1262     K      YKSLSVPAASTAKPPPLPRSNTVAS -0.13      82.00%
906      K      AMWFIRCRLPFRKDFVPFITKGLRS -0.17      80.42%
348      K      YEIVLSITRLIKKYRKELQVVAWDI -0.23      77.25%
599      K      YEMLVSHIQLHYKHSYTLPIASSIR -0.27      75.10%
347      K      SYEIVLSITRLIKKYRKELQVVAWD -0.31      72.71%
1251     K      ERFKEHRDTALYKSLSVPAASTAKP -0.32      72.05%
128      K      LGVLRALFFKVIKDYP SNEDLHERL -0.34      71.06%
1748     K      YPSKWIARLRHIKRLRQRICEEAAAY -0.34      71.03%
83       K      KKFEHAVEALWKAVADLLQPERPL -0.35      70.49%
1663     K      NDSGEDFKLGTIKGQFNFVHVIVTP -0.35      70.48%
1628     K      QAVFHIATLMPTKDQDKHRCDKKRH -0.36      70.06%
1168     K      PGPRTAPAAKPEKASAGTRVPVQEK -0.37      69.48%
258      K      TINVKELCEPCWKLMRNLLGTHLGH -0.39      68.25%
782      K      LTALISYHNYLDKTKQREMVYCLEQ -0.41      67.55%
1058     K      PVGEFLLAGGRTKTWLVGNKLVTVT -0.45      65.03%
16       K      PTSKDSGLKEKFKILLGLGTPRPNP -0.45      64.75%
72       K      MIGQICEVAKTKKFEHAVEALWKA -0.46      64.06%
704      K      VLLQCLKQESDWKVLKLVGLRPES -0.48      62.92%
12       K      *MAKPTSKDSGLKEKFKILLGLGTP -0.48      62.92%
106      K      PLEARHAVLALLKAIVQGQGERLGV -0.50      61.73%
930      K      SNVLLSFDDTPEKDSFRARSTSLNE -0.51      61.27%

```

Figura 3.2. Predicción de la acetilación en lisinas de TSC2 humana con el programa de MUSI-TE. En la primera columna de la izquierda de la imagen se observa el residuo de TSC2, y a la derecha la puntuación (expresada en porcentaje) de probabilidad de acetilación que da el programa (imagen incompleta). La imagen completa se muestra en la parte de la tesis denominada anexos.

- PAIL (<http://bdmpail.biocuckoo.org>): herramienta novedosa basada en un algoritmo de discriminación Bayesiana de predicción de sitios de acetilación *in silico*, así como de análisis de la función de dicha modificación postraduccional (Prediction of Nε-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method, Ao, L, HHS). La sensibilidad y la especificidad de éste método son muy elevadas (51.6/95.1%) (Li A., 2006).


```

<html><head></head><body><pre style="word-wrap: break-word; white-s
Peptide Position      Score      Threshold
****MAKPTSKDS      3      18.09      0.20
MAKPTSKDSGLKE      7      2.71      0.20
SKDSGLKEKFKIL      12     1.47      0.20
DSGLKEKFKILLG      14     0.51      0.20
GLKEKFKILLGLG      16     1.07      0.20
PRSAEGKQTEFII      34     1.49      0.20
QICEVAKTKKFEE      69     0.66      0.20
CEVAKTKKFEEHA      71     0.94      0.20
EVAKTKKFEEHAV      72     0.75      0.20
AVEALWKAVADLL      83     0.67      0.20
AVLALLKAIVQGQ      106    0.45      0.20
ERLEVFKALTDNG      144    1.05      0.20
LCEPCWKLMRNLL      258    0.72      0.20
SITRLIKKYRKEL      347    0.43      0.20
LIKKYRKELQVVA      351    1.23      0.20
RGAVRIKVLVDVLS      464    1.32      0.20
KDHQVRKLATQLL      506    0.63      0.20
ASLEDVKTAVLGL      561    0.83      0.20
PERGSEKKTSGPL      657    1.67      0.20
ERGSEKKTSGPLS      658    2.24      0.20
SDWKVLKLVLGRL      707    0.75      0.20
PESLRYKVLIFTS      720    0.63      0.20
SMLSGPKTLERLR      745    1.26      0.20
LPVLVVKLTHISA      829    0.59      0.20
CRLPFRKDFVPFI      906    0.51      0.20
FDDTPEKDSFRAR      930    0.50      0.20
SLNERPKSLRIAR      945    0.37      0.20
RIARPPKQGLNNS      954    1.78      0.20
NNSPPVKEFKESS      964    1.32      0.20
PPVKEFKESSAAE      967    2.10      0.20
QADDSLKNLHLEL      1016   0.38      0.20
NFTAVPKRSPVGE      1043   0.85      0.20
LAGGRTKTWLVGN      1058   0.37      0.20
TKEAPAKLESQAG      1111   1.18      0.20
RTAPAAKPEKASA      1165   2.41      0.20
PAAKPEKASAGTR      1168   2.45      0.20
RVPVQEKTNLAAY      1180   0.89      0.20
MAAERFKEHRDTA      1242   1.13      0.20
RDTALYKSLSVPA      1251   0.45      0.20
PAASTAKPPPLPR      1262   1.43      0.20
VSSQEEKSLHAAE      1345   1.08      0.20
PSQPLSKSSSSPE      1384   2.53      0.20
LGDPGDKADVGR      1404   1.25      0.20
RLSPEVKARSQSG      1415   0.87      0.20
APSRRGKRVERDA      1473   3.13      0.20
VERDALKSRATAS      1481   0.84      0.20
TASNAEKVPGINP      1491   0.62      0.20
GRLIELKDCQPKD      1585   0.93      0.20
ATLMPTKDVDKHR      1628   0.60      0.20
PTKDVDKHRCDDK      1632   1.00      0.20
DKHRCDKKRHLGN      1637   1.83      0.20
KHRCDDKKRHLGND      1638   2.11      0.20
DSGEDFKLGTIKG      1658   0.31      0.20
VSLQCRKDMEGLV      1689   0.27      0.20
VDTSVAKIVSDRN      1701   0.74      0.20
ARLRHIKRLRQRI      1748   1.83      0.20
HPPSHSKAPAQTP      1775   1.36      0.20
</pre></body></html>

```

Figura 3.3. Predicción de la acetilación en lisinas de TSC2 humana con el programa de PAIL. La primera columna de la izquierda de la imagen corresponde a una región peptídica de la proteína TSC2, seguida de la posición del residuo de lisina en cuestión, y a continuación la probabilidad de acetilación que da el programa (imagen incompleta). La columna de la derecha es el threshold, que en este caso corresponde a un rigor medio. La imagen completa se muestra en la parte de la tesis denominada anexos.

- Lysacet (<http://www.biosino.org/LysAcet/>): la exactitud de predicción superior de LysAcet se atribuye principalmente a la utilización de patrones de acoplamiento de secuencia, que describen la posición relativa de dos aminoácidos. LysAcet contribuye a la limitada investigación de predicción de PTM en lisina epsilon-acetilación, y puede servir como un enfoque complementario para explorar acetilación en proteomas (Li S. , 2009).
- Además, se usó un programa de predicción de sitios de desacetilación y de función basado en el análisis de la secuencia proteica, para identificar posibles sitios de desacetilación mediados por la proteína SIRT1: ASEB (acetylation set enrichment-based) (Wang, 2012) (Li T. , 2012) (mirar en anexos).

3.7 Cuantificación

Los blots fueron cuantificados usando el programa Image J (National Institutes of Health), con la herramienta de “Analyze gels”. Fueron seleccionadas regiones rectangulares de mismo área para todos los puntos del blot y se obtuvieron representaciones de la densidad de señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control de carga (β -actina o tubulina).

3.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Se utilizó one-way ANOVA para comparación múltiple (Bonferroni's post-test), o bien, para análisis comparativo de dos datos, el t test (unpaired). Como valor de discriminación de diferencias estadísticamente significativas se utiliza $p \leq 0.05$.

3.7. MATERIALES

3.7.1. LISTADO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución (Uso)
P-ACC (S79)	Cell Signaling (#3661)	IgG rabbit	1:1000 (WB)
ACC total	Cell Signaling (#3662)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Acetylated-Lysine	Cell Signaling (# 9441)	IgG rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
P-AMPK (T172)	Cell Signaling (#2531)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
AMPK α total	Cell Signaling (#2352)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
β -actina (AC-74)	Sigma-Aldrich (A5316)	mAb IgG1 Mouse	1:5000 (WB)
BIP	Cell Signaling (#3177)	mAb IgG Rabbit	1:1000 (WB)
CHOP (B-3)	Santa Cruz (sc-7351)	mAb IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
Flag	Sigma-Aldrich (F1804)	mAb IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
GFP (B-2)	Santa Cruz Biotechnology (sc-9996)	mAb IgG Mouse	1:1000 (WB)
HA	Sigma-Aldrich (H6908)	IgG Rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
HADHA	Abcam (ab54477)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Hsp60	Enzo Life Sciences, ADI-SPP-741	IgG Mouse	1:1000 (WB)
LC3B	Cell Signaling (#4108)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Nitrotirosina	Merck Millipore (#06-284)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
p62/SQSTM1	Progen (GP62)	IgG Guinea pig	1:1000 (WB)
p70S6K	Cell Signaling (#9202)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PGC-1 α (3GS)	Cell Signaling (#2178)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
P-p70S6K (Thr-389)	Cell Signaling (#9205)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PINK1	Novus Biologicals (BC100-494)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
P-RAPTOR	Cell Signaling (#2083)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
RAPTOR	Cell Signaling (#4978)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
S6 (5G10)	Cell Signaling (#2217)	mAb IgG Rabbit	1:1000 (WB)
P-S6 (S235/236)	Cell Signaling (#2211)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
SIRT1 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology (sc-15404)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
Tom20 (FL-145)	Santa Cruz Biotechnology (sc-11415)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP) 1:50 (IF)
α -Tubulina	Sigma-Aldrich (T6199)	mAb IgG1 Mouse	1:5000 (WB)
TSC2	Cell Signaling (#3612)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
TSC2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology (sc-892)	IgG Rabbit	1:100 (IP)
TSC2 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology (sc-893)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Ubiquitina (FK2-H)*	Enzo Life Sci (BML-PW0150)	mAb IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
V5	Life Technologies (R960-25)	mAb IgG2 Mouse	1:1000 (WB)

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios. mAb (monoclonal). WB, western-blot; IP, inmunoprecipitación.

3.7.2. LISTADO DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Conjugado	Dilución (Uso)
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:5000 (WB)
Sheep anti-mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:3000 (WB)
Rabbit anti-guinea pig	Abcam (ab-6771)	HRP	1:7000 (WB)

3.7.3. REACTIVOS

Los reactivos comunes de laboratorio fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales.

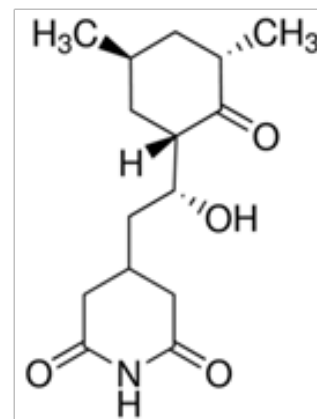
- Merck Millipore: Triton X-100 y Tween-20.
- Panreac (Castellar del Vallés): ácido acético, etanol, glicerol, glicina, HCl, isopropanol, metanol y NaCl.
- Pronadisa (Torrejón de Ardoz): agar bacteriológico, agarosa, extracto de levadura y triptona.
- Roche: aprotinina, leupeptina y PMSF.
- Santa Cruz (Santa Cruz, EE.UU.): geneticina e higromicina.
- Sigma-Aldrich: anfotericina B, ampicilina, CHAPS, DAPI, DMSO, EDTA, EGTA, estreptomycin, HEPES, kanamicina, 2-mercaptoetanol, NaF, paraformaldehído, penicilina G, puromicina, SDS y Tris base (Trizma).

3.7.4. AGENTES FARMACOLÓGICOS USADOS

Cicloheximida (CHX): Sigma-Aldrich (C4859).

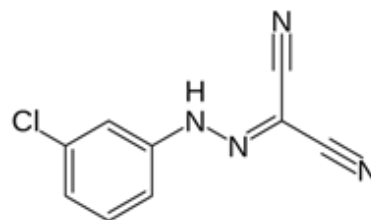
Es un inhibidor de la síntesis proteica en los eucariotas, y es producido por la bacteria *Streptomyces griseus*. Actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S bloqueando la fase de elongación en la traducción.

- Solubilidad: Agua.
- Concentración efectiva: 6-100 $\mu\text{g/ml}$.



Carbonilcianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP): Wako Chemicals, Osaka, Japón.

Es un inhibidor químico de la fosforilación oxidativa. Es un nitrilo, hidrazona y protonóforo. En general, el CCCP causa la destrucción de las células vivas y la muerte del organismo (referencias). El CCCP causa un desacoplamiento del gradiente de protones establecido durante la actividad normal de portadores de electrones en la cadena de transporte de electrones. Esta sustancia química actúa esencialmente como un ionóforo y reduce la capacidad de ATP sintasa para funcionar optimamente.

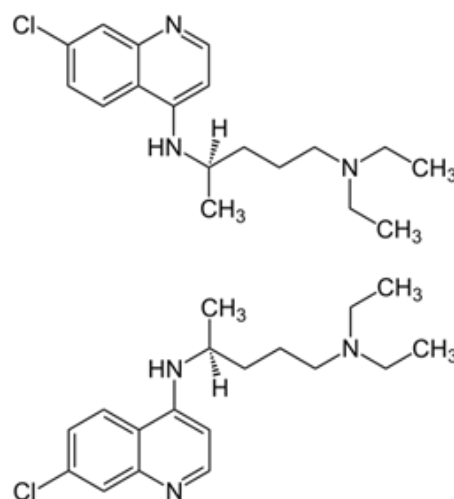


- Solubilidad: DMSO.
- Concentración efectiva: 5-20 µg/ml.

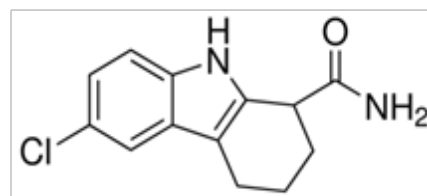
Cloroquina (CQ), sal difosfato: Sigma-Aldrich (C6628).

Es un agente lisosomotrópico (capacidad de entrar selectivamente dentro de los lisosomas). La cloroquina aumenta el pH lisosomal, lo que conduce a una inhibición de la fusión entre el lisosoma y el autofagosoma, y disminuye la degradación proteica lisosomal. Es un fármaco del grupo de las 4-aminoquinolinas que se utiliza en el tratamiento o prevención de la malaria, así como en el de determinadas enfermedades autoinmunitarias, como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico.

- Solubilidad en agua.
- Concentración de uso: 10-25 µM (µM).

**EX-527 (6-cloro-2,3,4,9-tetrazol-1h-carbazol-1-carboxamida): Sigma-Aldrich (E7034)**

EX-527 es un potente y selectivo inhibidor de SIRT1 (IC50 38 nM). Es más selectivo para SIRT1 que para SIRT2 o SIRT3. Estructuralmente, ocupa el sitio de unión de la NAM (bolsillo hidrofóbico C de SIRT1) que es requerido para la formación del intermediario de reacción O-alkylimidato.

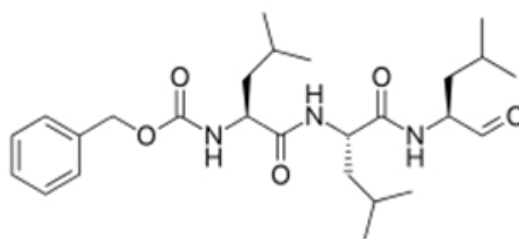


- Solubilidad en DMSO.
- Concentración de uso: 100 nM.

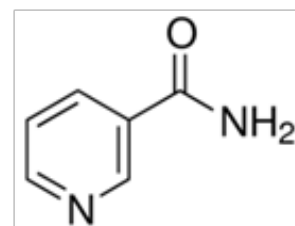
MG-132: Enzo Life Sci. (Pi-102-0005).

Es un inhibidor del proteasoma. Reduce la degradación de proteínas marcadas con ubiquitina.

- Solubilidad en DMSO.
- Concentración efectiva: 10-20 μ M.

**Nicotinamida (NAM): coenzima y cofactor. Sigma-Aldrich (N72340).**

Es la amida derivada de la vitamina B3 o niacina. A bajas concentraciones, es el sustrato para la síntesis de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y de la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT).



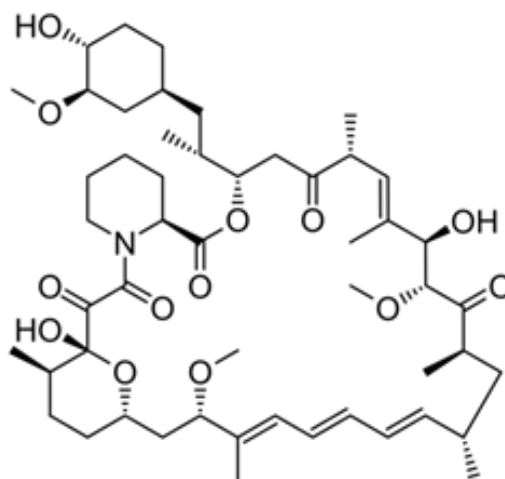
La desacetilación de histonas y proteínas mediada por la enzima sirtuina 1 (SIRT1) es dependiente de NAD⁺ y produce como producto de la reacción nicotinamida, siendo éste último un inhibidor alostérico de la actividad de SIRT1 a altas concentraciones (5mM).

- Solubilidad en agua.
- Concentración efectiva: 5 mM.

Rapamicina-Sirolimus (RAPA): Merck-Millipore (553210).

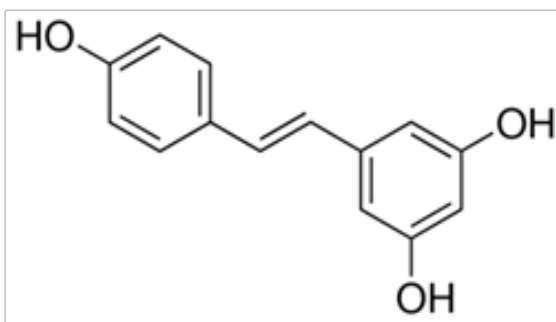
Macrólido producto de *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina es un inmunosupresor y actúa al unirse a FKBP12, y el complejo es capaz de asociarse a mTORC1, inhibiéndolo. Sin embargo, a las dosis utilizadas frecuentemente, solo es capaz de inhibir a mTORC1, y no a mTORC2.

- Solubilidad en DMSO.
- Concentración efectiva: 20-40 nM.



Resveratrol (RESV): Sigma-Aldrich (R5010)

Es una fitoalexina fenólica presente en frutos como uvas, bayas y en las raíces secas de *Polygonum cuspidatum*. Es un potente activador de SIRT1 y presenta numerosos efectos intracelulares (antioxidante, antiinflamatorio, antienviejamiento, antitumoral...). Además, el resveratrol es capaz de inhibir de manera competitiva varias fosfodiesterasas, lo cual da como resultado un incremento en la concentración de AMPc en el citosol, esto actúa como un mensajero secundario para la activación de la vía AMPK/SIRT1/PGC-1 α . Este incremento en la concentración de AMPc permite aumentar la oxidación de los ácidos grasos, la biogénesis mitocondrial, la respiración mitocondrial y la gluconeogénesis



- Solubilidad en DMSO.
- Concentración de uso: 25 μ M-100 μ M (50 μ M).

3.7.5. LISTADO DE PLASMIDOS**HA-TSC2:**

- Origen: Addgene, #24939. Proviene del Dr. Kun-Liang Guan (Departamento de Farmacología, Universidad de California, San Diego)
- Resistencia: Ampicilina (100 μ g/ml).

Flag-Sirt1:

- Origen: Cedido por el Dr. Pere Puigserver (Dpto de Biología celular, Dana-Farber Cancer Institute, Boston)
- Resistencia: Kanamicina (50 μ g/ml).

Sirt1-NES2-GFP y Sirt1-NLS2-GFP:

- Origen: Fueron cedidos por el Dr. Yoshiyuki Horio (Dpto. de Farmacología, Universidad de Sapporo, Japón).
- Resistencia: Kanamicina (50 μ g/ml).

TSC2V5, A1153V5, F904V5, A614V5, M1453V5, -EX31, +EX31, -EX31 K599M, +EX31 K599M

- Origen: Cedidos por el Dr. Mark Nellist (Dpto. de Genética clínica, Centro Médico de Erasmus, Rotterdam)
- Resistencia: Ampicilina (100 μ g/ml).

-EX31 TSC2 K106Q:

- Origen: Cedido por el Dr. Raphael Schiffman (Instituto de enfermedades metabólicas en el Instituto de Investigación de Baylor, Dallas).
- Resistencia: Ampicilina (100 µg/ml).

HA-Parkina (PARK2): Addgene, #17613.

- Resistencia: Ampicilina (100 µg/ml).

pBABEpuro GFP-LC3: Addgene, #22405.

- Resistencia: Ampicilina (100 µg/ml).

pBABEpuro SV40 LT: Addgene, #13970.

- Resistencia: Puromicina (1 µg/ml).

pLenti CMV rtTA3 Blast: Addgene, #26429.

- Resistencia: Ampicilina (100 µg/ml).

pTRE-Tight-MitoTimer: Addgene, #50547.

- Resistencia: Ampicilina (100 µg/ml).

4 RESULTADOS



4.1. Modulación de la ruta mTORC1, la proliferación y la autofagia mediada por la regulación del estado de acetilación de la proteína TSC2.

4.1.1. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 modula la vía de mTORC1 y la autofagia.

Es bien conocida la importancia del complejo TSC1-TSC2 en la integración de la señalización energética y de factores de crecimiento, así como en el control negativo de la ruta de mTORC1. Datos previos de nuestro grupo, habían demostrado el papel esencial de TSC2 en la regulación de la proliferación de la célula β *in vitro* (Bartolomé, 2010). El grupo de Ghosh demostró la interacción de las proteínas SIRT1 y TSC2 en células HeLa, y la modulación de la ruta de mTORC1 (Ghosh, 2010).

Sin embargo, no se conoce el papel del estado de acetilación/desacetilación de TSC2 sobre la regulación de esta vía. Para dilucidar el papel de las sirtuinas en la regulación de mTORC1 vía TSC2, usamos la línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293T) y estimulamos con dos moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1, la NAM (inhibidor alostérico) y el RESV (activador) durante 2 y 4 horas. A continuación, recogimos el experimento y realizamos un WB para ver la activación de la ruta de mTORC1, y una IP de las lisinas acetiladas y WB frente a TSC2.

En primer lugar, observamos que la estimulación con NAM (5 mM) aumentó la acetilación en lisinas de TSC2 a todas las horas, e incrementó la fosforilación de la treonina 389 de la p70 (diana de mTORC1), lo cual indica una activación de la ruta de mTORC1. Por otro lado, el tratamiento con RESV (50 μ M) mantuvo el estado de acetilación de TSC2, y disminuyó la actividad de mTORC1. La asociación física de TSC2 y SIRT1 se demostró mediante inmunoprecipitación de TSC2 y WB frente a SIRT1. Además, encontramos que dicha interacción se vio incrementada en respuesta a RESV (Figura 4.1).

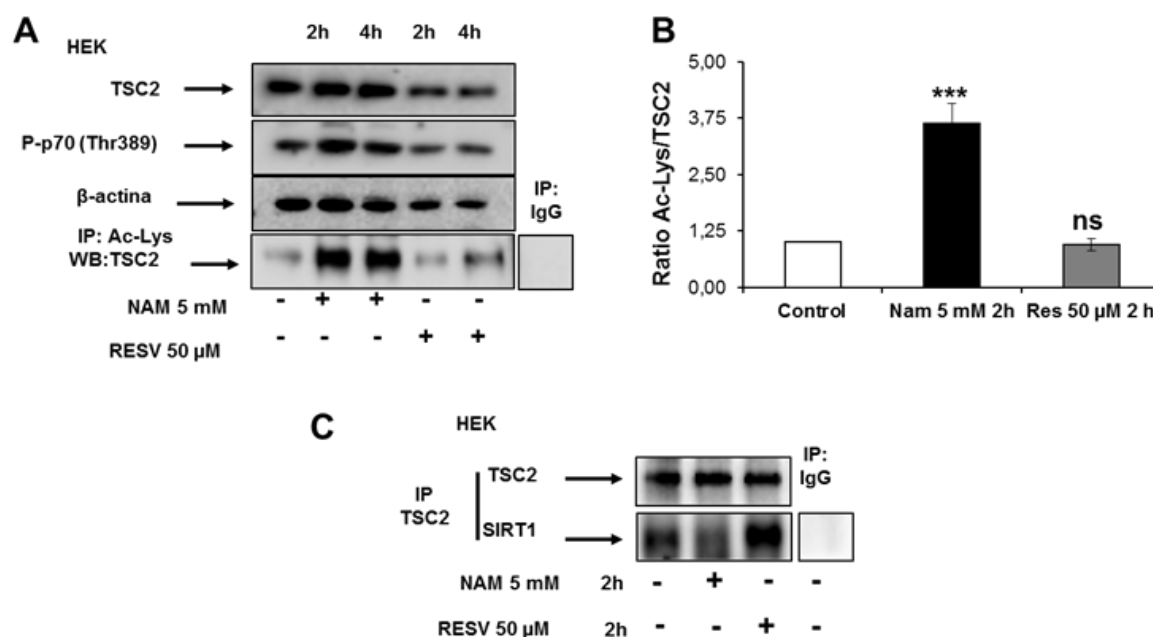


Figura 4.1. Modulación del estado de acetilación en lisinas de TSC2 y la regulación de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV. (A) Inmunoprecipitación (IP) de las lisinas acetiladas (Ac-Lys) endógenas procedentes de células HEK 293T estimuladas o no con NAM y RESV durante 2 y 4 h, y WB con el anticuerpo de anti-TSC2. Asimismo, se realizaron WB frente a las proteínas P-p70 (T389), TSC2 y β-actina. (B) Cuantificación del ratio de lisinas acetiladas de TSC2 en respuesta a NAM o RESV, representados como la media ± la desviación estándar (SD). *** $P < 0.001$; n.s. sin diferencia significativa. (C) IP del TSC2 endógeno de células HEK 293T en respuesta a NAM y RESV (2h), y WB frente a SIRT1 y TSC2 para ver su asociación física.

Se ha descrito que SIRT1 es una proteína que se encuentra fundamentalmente en el núcleo, aunque presenta un transporte núcleo-citoplasma, gracias al cual puede localizarse también en el citoplasma en respuesta a diferentes estímulos. En su estructura se localizan secuencias de localización nuclear (NLS) y de exclusión nuclear (NES) (Tanno, 2007). Sin embargo, TSC2 es una proteína fundamentalmente citoplasmática. Para corroborar estos datos obtenidos con proteínas endógenas, hicimos experimentos de co-transfección de manera transitoria con las proteínas recombinantes HA-TSC2, Flag-SIRT1-WT, SIRT1-WT-GFP, SIRT1-NL2-GFP (de localización exclusivamente citoplasmática) y SIRT1-NES-GFP (de localización exclusivamente nuclear). En primer lugar observamos directamente en el microscopio la localización de los diferentes mutantes de SIRT1, así como la eficiencia de la transfección con un WB frente a GFP (SIRT1 sobreexpresado) (Figura 4.2).

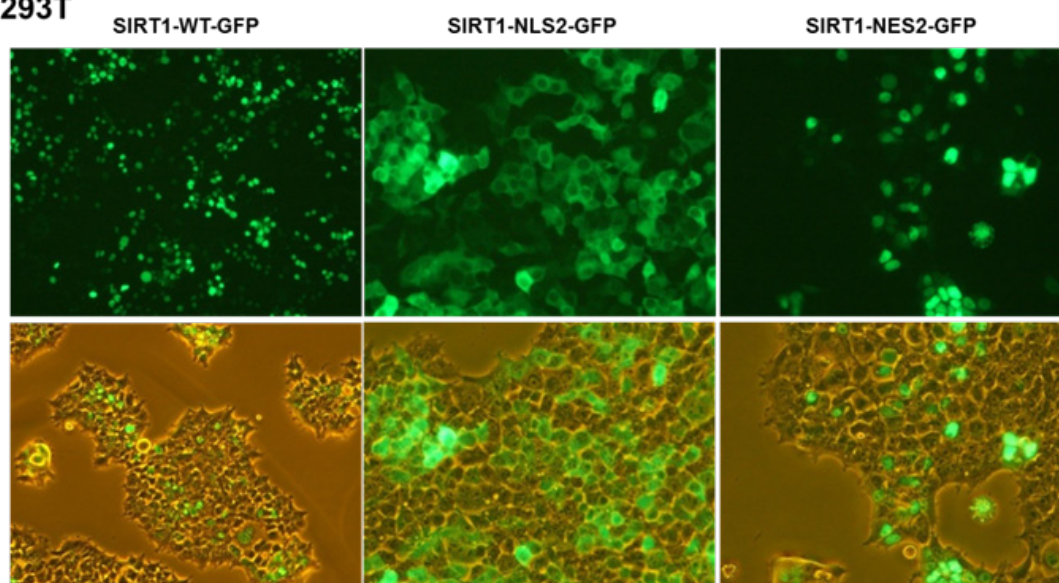
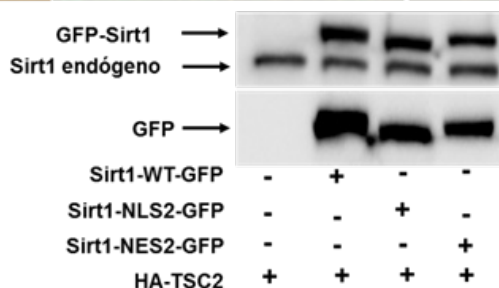
A**HEK 293T****B**

Figura 4.2. Localización de los diferentes mutantes de SIRT1 (SIRT1-WT-GFP, SIRT1-NLS2-GFP y SIRT1-NES2-GFP). (A) Imágenes tomadas directamente del microscopio de células HEK 293T co-transfectadas con las proteínas recombinantes HA-TSC2 y los diferentes mutantes de SIRT1. (B) WB de SIRT1 endógeno y sobreexpresado (GFP) procedente de las células transfectadas y sin transfectar.

Al día siguiente de la transfección, cambiamos el medio por medio fresco, y 24h después, estimulamos con NAM o RESV (2h). Tras recoger el experimento, se realizaron WB para examinar la actividad de la ruta mTORC1 y marcadores de autofagia (medido por LC3B-II o LC3B lipídido), así como inmunoprecipitación de las lisinas acetiladas y WB frente a TSC2 (Figura 4.3).

El análisis reveló que la NAM estimuló la vía de mTORC1, no potenció la respuesta autofágica, e incrementó la acetilación en las lisinas de TSC2 en todos los casos. Por otro lado, el resveratrol, inhibió la vía de mTORC1, y evitó (en los casos de SIRT1-WT y SIRT1-NES2) o disminuyó (SIRT1-NLS2) la acetilación de TSC2. Asimismo, RESV indujo la respuesta autofágica en todos los casos, aunque en menor medida en el caso en el que SIRT1 se localizaba predominantemente en el núcleo. Aquí, como control de que el resveratrol había funcionado se realizó una inmunoprecipitación de las lisinas acetiladas y WB frente a PGC1 α (diana de SIRT1) (Figura 4.3).

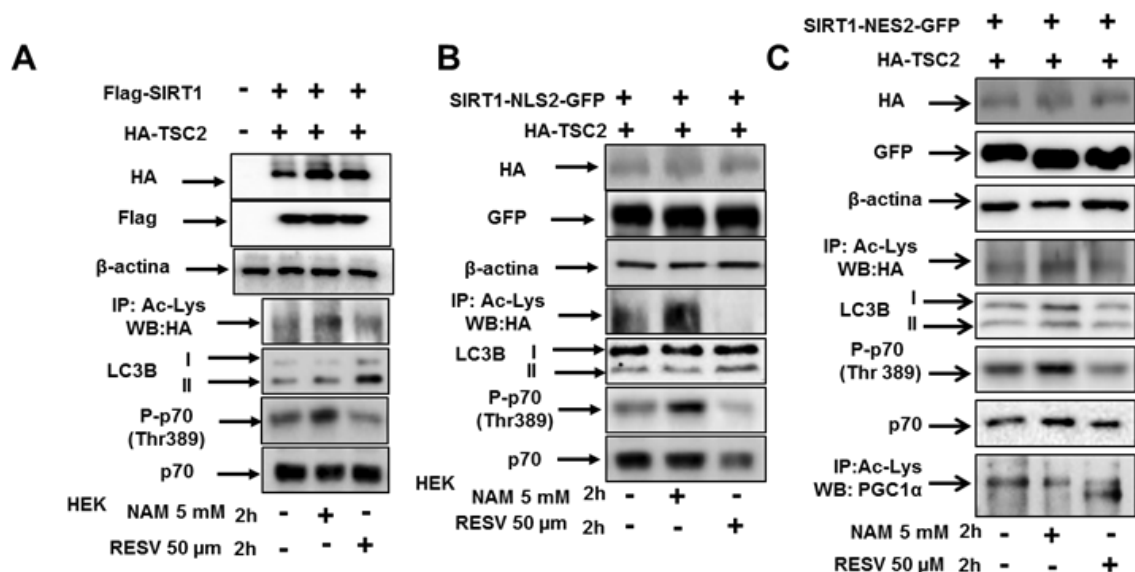


Figura 4.3. NAM indujo la vía de mTORC1 y la acetilación de TSC2 sin efectos sobre la autofagia, y el RESV evitó la acetilación de TSC2 y la ruta de mTORC1, activando la autofagia en las células HEK 293T transfectadas con proteínas recombinantes de TSC2 y SIRT1. Un día después de la transfección con HA-TSC2 y Flag-SIRT1 (A), o SIRT1-NLS2-GFP (B), o SIRT1-NES2-GFP (C), las células se cambiaron de medio, y 24 h más tarde, fueron sometidas a tratamientos con NAM y RESV durante 2 h. Se recogieron los experimentos y se realizaron WB para analizar la vía de mTORC1, la acetilación de TSC2 y la respuesta autofágica. * Banda inespecífica.

4.1.2. SIRT1 modula el estado de acetilación en lisinas TSC2 en su región N-terminal, afectando a la estabilidad de la proteína y regulando la vía mTORC1 y la autofagia.

Para confirmar el papel de SIRT1 en el control del estado de acetilación de TSC2, usamos células MEF *Sirt1* $+/+$ y *Sirt1* $-/-$. En los MEF *Sirt1* $+/+$ la NAM estimuló la vía de mTORC1 y aumentó la acetilación de TSC2, mientras que el RESV disminuyó la actividad de mTORC1 y mantuvo el estado de acetilación de TSC2 (Figura 4.4). Por otro lado, se observó que el estado de acetilación de TSC2 y la actividad de mTORC1 estaba significativamente aumentada en las células MEF *Sirt1* $-/-$. Por el contrario, los efectos de NAM y RESV sobre la acetilación de TSC2 y la vía de mTORC1 se vieron abolidos en los MEF *Sirt1* $-/-$, así como tras la estimulación con el inhibidor químico de la actividad desacetilasa de SIRT1, el 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxamida (Ex-527) en las células MIN6 (Figura 4.4).

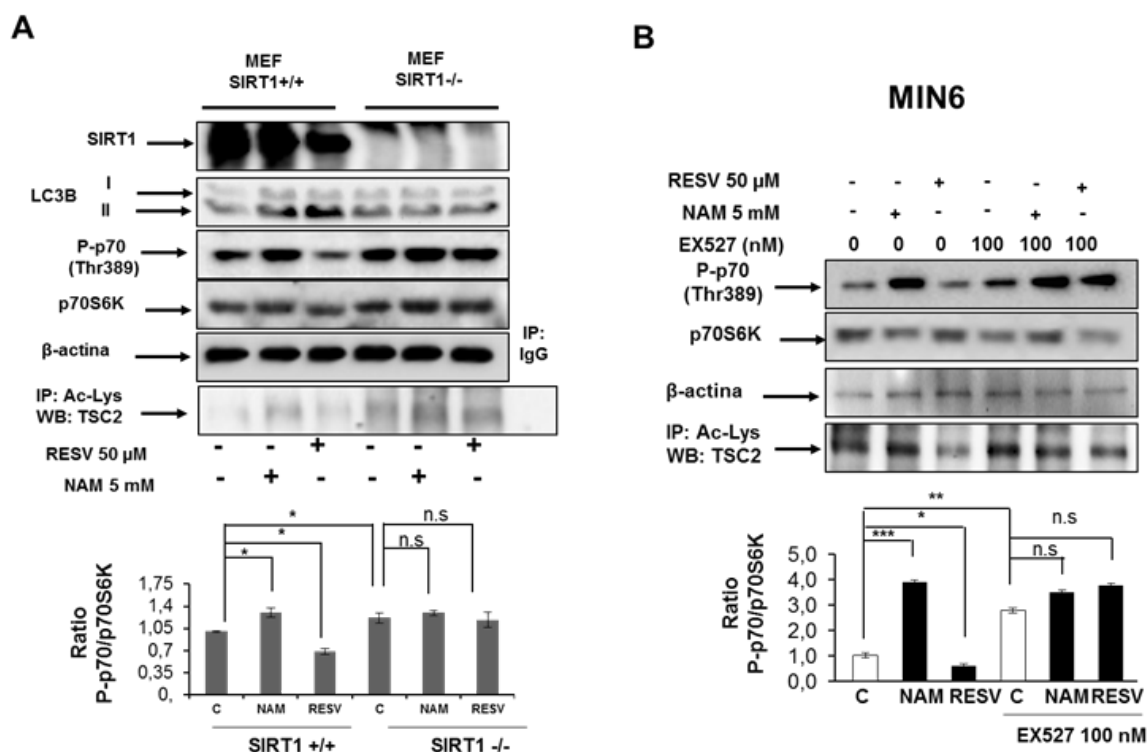


Figura 4.4. La modulación del estado de acetilación de TSC2 y la actividad de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV es dependiente de SIRT1. (A) Las células MEF Sirt1 ^{+/+} y Sirt1 ^{-/-} se dividieron, y al día siguiente fueron estimuladas, o no, con NAM y RESV durante 2 h. (B) Las células MIN6 sin y con un pretratamiento de 30 minutos del Ex-527 (100 nM), y a continuación estimuladas con NAM y RESV durante 2 h. Se analizaron por WB la expresión de proteínas relacionadas con la ruta mTORC1, la autofagia, así como la acetilación de TSC2 mediante IP de Ac-Lys y WB de TSC2. Histogramas que representan el ratio P-p70 (T389)/p70total expresados como la media de tres experimentos diferentes \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s. sin diferencia significativa.

Lo que nos propusimos a continuación fue determinar la zona de interacción entre SIRT1 y TSC2. Para ello, co-transfectamos las células HEK 293T con las proteínas recombinantes Flag-SIRT1, y diversos constructos recombinantes de TSC2 que contenían diferentes regiones de la proteína fusionados con la etiqueta V5. Al día siguiente se cambió el medio por medio completo, y un día después las células se estimularon con NAM y RESV durante 2h. Se realizaron IP de las lisinas acetiladas seguido por un análisis por WB. Por un lado, la NAM incrementó, y el RESV disminuyó la acetilación de TSC2 en el constructo completo de TSC2 (TSC2V5), así como en aquellos constructos parciales que contenían la región N-terminal (A1153V5, F904V5 y A614V5). Sin embargo, no observamos cambios en el estado de acetilación de TSC2 en respuesta a NAM y a RESV en el constructo parcial que contenía el dominio GAP y perdía su región N-terminal (Figura 4.5).

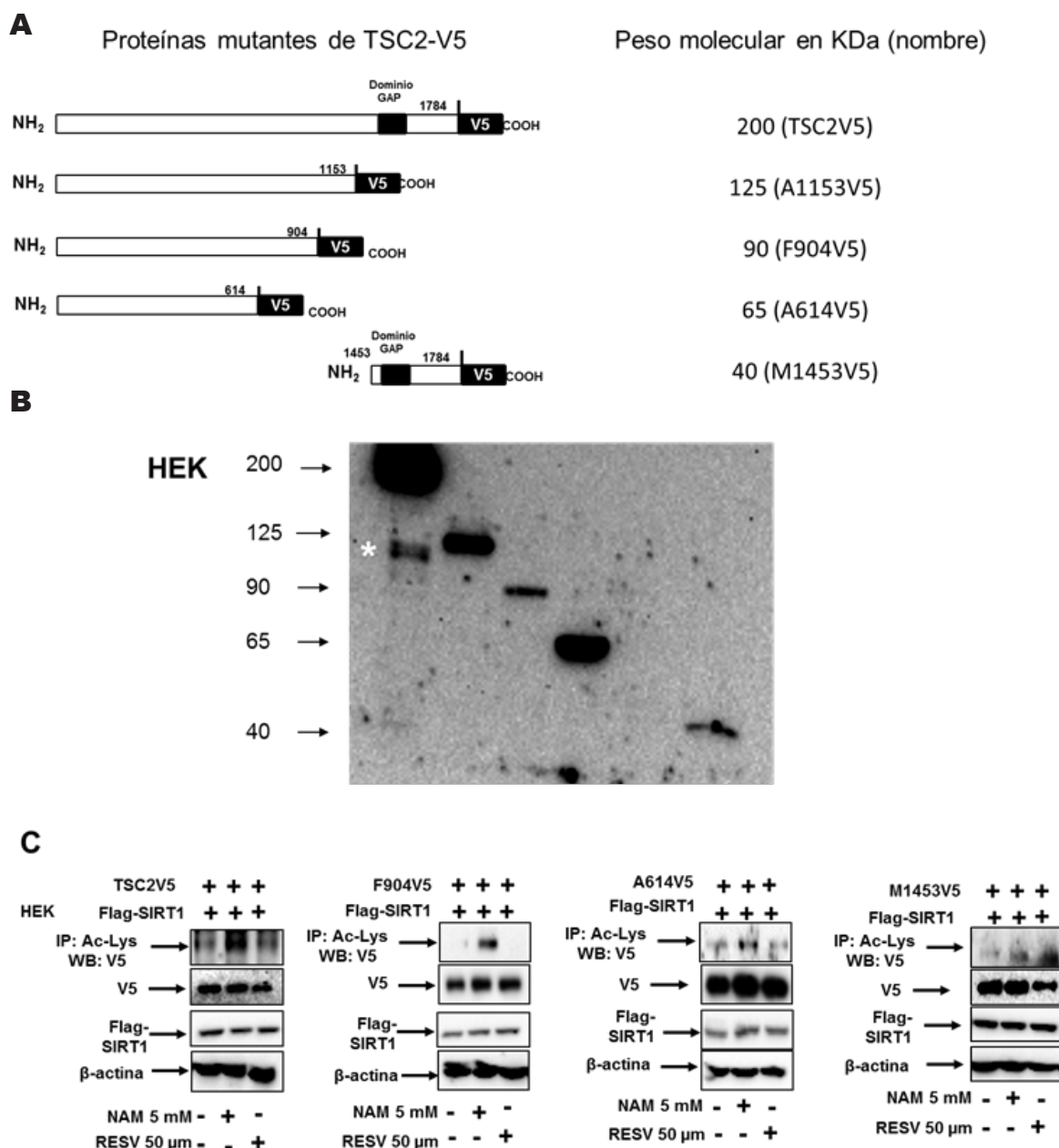


Figura 4.5. SIRT1 desacetila a TSC2 por su región N-terminal. (A) Esquema representativo de los diferentes mutantes de TSC2 unidos a V5, con su respectivo tamaño molecular y su nombre. (B) WB de V5 de todos los mutantes a su correspondiente altura. (C) Las células HEK 293T fueron co-transfectadas de manera transitoria con diferentes constructos mutados de TSC2 unidos con el péptido recombinante V5 y Flag-SIRT1. Después de 24h, el medio se reemplazó por medio fresco, y al día siguiente, las células fueron tratadas con NAM o RESV durante 2h. Se realizaron IP con anticuerpos frente a las lisinas acetiladas, seguido de un análisis por WB. * Banda inespecífica.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la acetilación en lisinas de TSC2 jugaba un papel en la estabilidad de esta proteína y en el control de la ruta de mTORC1. Observamos que los niveles de la proteína TSC2 estaban disminuidos en las células MEF *Sirt1* ^{-/-} (hiperacetilación de TSC2), en comparación con sus controles (MEF *Sirt1* ^{+/+}). Además, encontramos un aumento en el grado de unión de ubiquitina con la proteína TSC2 mediante una inmunoprecipitación de la proteína ubiquitina (FK2, que reconoce las proteínas mono- y poli-ubiquitinadas, pero no la ubiquitina libre), y western blot con el anticuerpo que reconoce TSC2 (Figura 4.6).

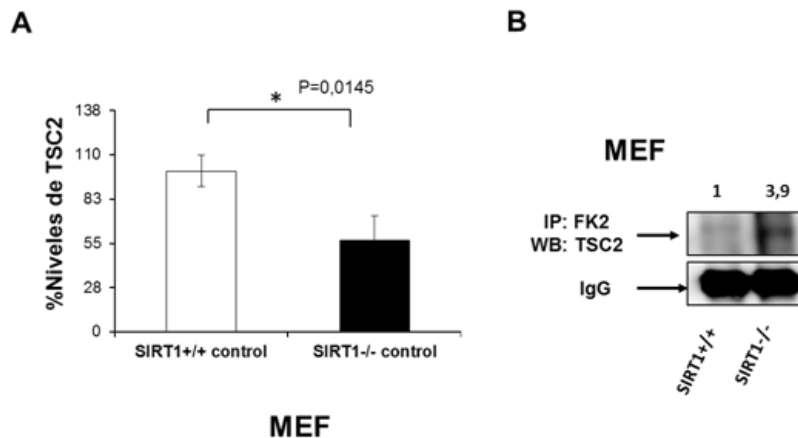


Figura 4.6. Menor estabilidad de la proteína TSC2 en las células MEF Sirt1 -/-. (A) Cuantificación de los niveles de la proteína TSC2 procedente de blots correspondientes a las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-, representados como la media de tres experimentos diferentes \pm la desviación estándar (SD). * $P < 0.05$. (B) Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FK2, y WB frente a TSC2 de las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-.

Además, sometimos a las células HEK 293T a una estimulación con NAM o RESV. A continuación, analizamos el estado de ubiquitinación de TSC2 mediante un análisis por IP de TSC2 y WB con el anticuerpo anti-FK2. En respuesta a NAM, se incrementó la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, favoreciendo su degradación por el sistema ubiquitina- proteasoma. Por el contrario, el tratamiento con RESV redujo la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, incrementando la estabilidad de la proteína (Figura 4.7).

En este contexto, cuando corregimos con la proteína frente a la cual inmunoprecipitamos (TSC2) detectamos una cantidad menor de TSC2 en las células tratadas con NAM, así como unos mayores niveles de TSC2 en los tratamientos con RESV. Estos datos parecen indicar que estos tratamientos afectan a la vida media de TSC2. Para corroborar esta hipótesis, sometimos a las células HEK 293T a un pretratamiento con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), y a continuación, estimulamos con NAM o RESV durante 4 horas. El análisis reveló que los niveles de TSC2 en respuesta a RESV (80-90% a las 4 horas) eran similares a las células control, y significativamente mayores en comparación con NAM (40% a las 2h y 20% a las 4 horas), lo cual indica una correlación directa entre la acetilación de TSC2 y la disminución de la estabilidad o la degradación de la proteína (Figura 4.7).

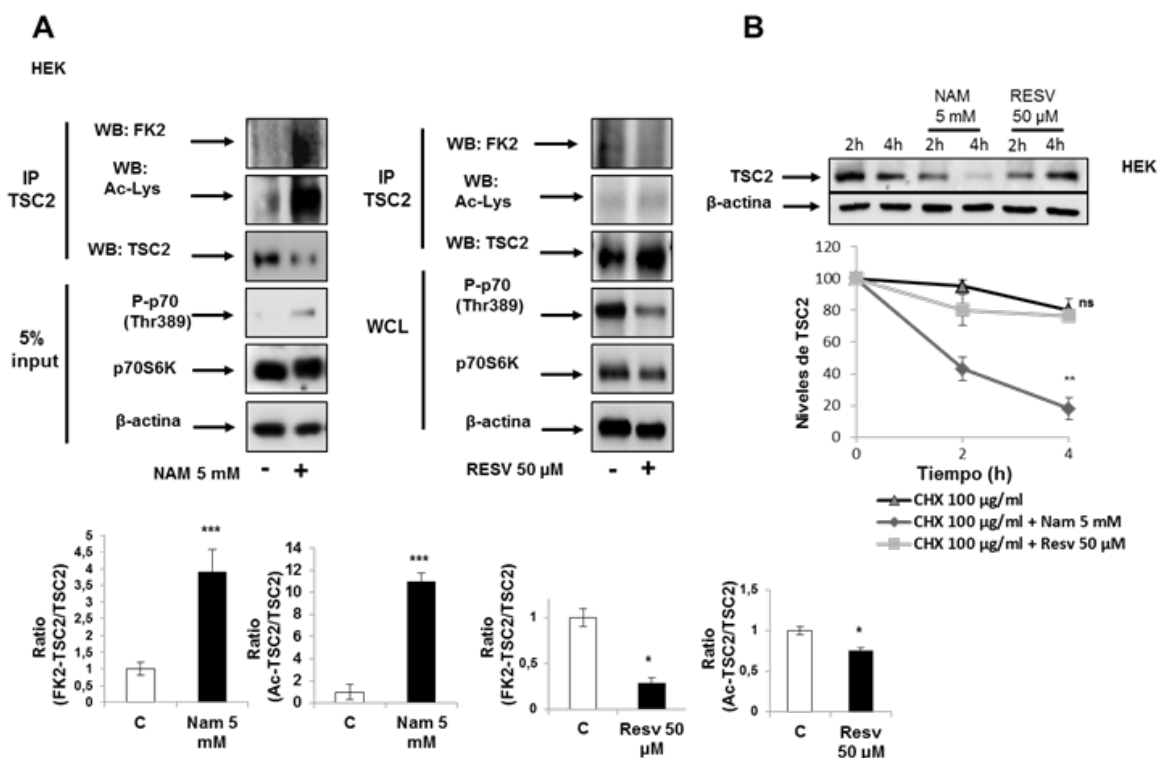


Figura 4.7. La acetilación de TSC2 está correlacionada con una mayor ubiquitinación y degradación de la proteína. (A) Las células HEK 293T fueron sometidas a un tratamiento con NAM o RESV (2h), seguido de una IP de TSC2 y análisis por WB de FK2 y Ac-Lys. Para corroborar que los agonistas habían funcionado correctamente, se realizó un WB con el sobrenadante de la IP (en el caso de la NAM) o el extracto total (en el caso del RESV) para analizar la señalización de mTORC1. Todos los blots son representativos de al menos tres experimentos diferentes, y los correspondientes ratios (FK2/TSC2 y Ac-Lys-TSC2) están representados en los histogramas de barras expresados con la media \pm S.D. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (B) Las células HEK 293T fueron estimuladas con cicloheximida (CHX, 100 μ g/ml) durante 30 minutos, y después, tratadas con NAM o RESV (4h). Después, se lavó dos veces con PBS y se lisó para la extracción proteica y el análisis por WB de TSC2. Los valores fueron obtenidos de tres experimentos diferentes y expresados como media \pm S.D. ** $P < 0.01$. n.s. sin diferencia significativa.

4.1.3 Los mutantes de TSC2 (K106Q y K599M) presentan una estabilidad diferente, y una regulación diferencial de la ruta de mTORC1 y de la autofagia

El origen de la enfermedad del complejo de esclerosis tuberosa (TSC) radica en la mutación de los genes *Tsc1* y *Tsc2* que conducen a la pérdida de la función de los mismos y a una hiperactivación de la ruta de mTORC1.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar el o los residuos de lisinas de la proteína TSC2 susceptibles de acetilación. Para ello, usamos tres programas computacionales diferentes de predicción de posibles residuos internos de acetilación: (<http://bdmpail.bocuckoo.org>) Lysacet 1.1 (<http://www.biosino.org/LysAcet/>) y Musite (musite.net). En ellos encontramos dos residuos de lisinas susceptibles de ser acetiladas en la región N-terminal de TSC2 (K106 y K599). A

continuación, decidimos explorar el efecto sobre la vía de mTORC1 de dos variantes de TSC2 presentes en diferentes pacientes con esclerosis tuberosa (K106Q y K599M). Por otro lado, hay múltiples sitios de desacetilación en TSC2 mediados por la actividad de SIRT1. Con el programa ASEB, un servidor web basado en una caracterización y predicción a priori de un conjunto de secuencias o sitios específicos de acetilación, determinamos que tanto la lisina 106 como la 599 eran residuos candidatos a ser regulados por la modulación de la actividad de SIRT1.

Para validar que ambos residuos estaban regulados por el estado de acetilación/desacetilación, co-transfectamos las HEK 293T con Flag-SIRT1 y TSC2-WT o TSC2 K599M. La NAM estimuló la vía de mTORC1 en ambos casos, pero en menor medida en el mutante K599M comparado con el WT. Por el contrario, el resveratrol disminuyó en ambos casos la ruta de mTORC1 (Figura 4.8). El otro mutante de TSC2 (K106Q) el cual representa un mimético de acetilación, presentó un aumento en la actividad de mTORC1 de manera basal en comparación con el WT, asimismo, tanto la NAM y el RESV seguían modulando dicha ruta (Figura 4.8).

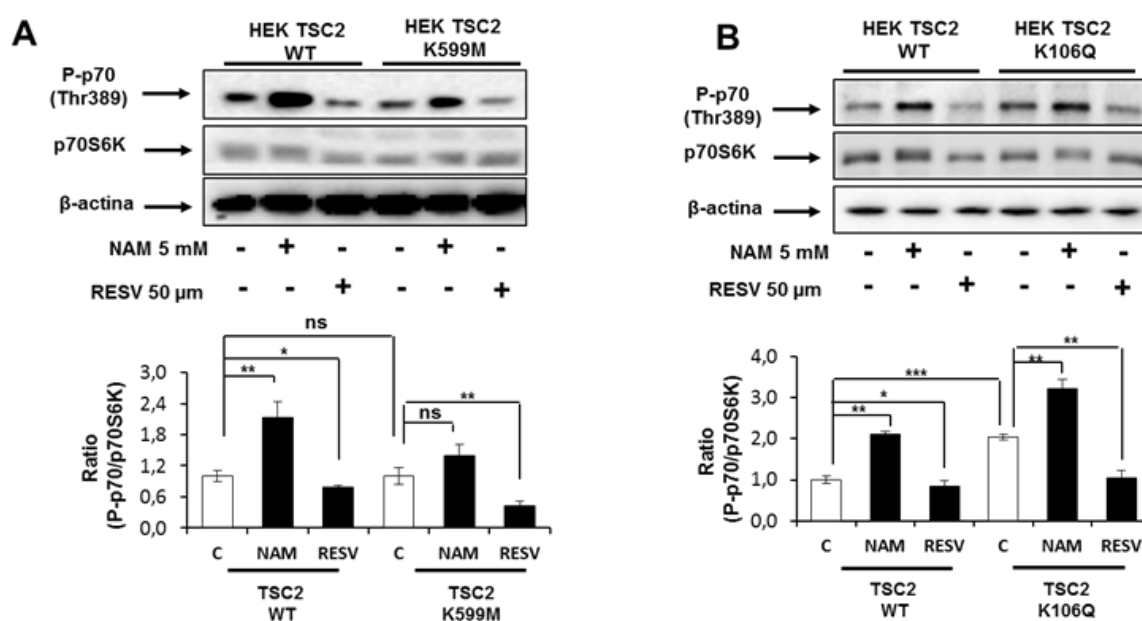


Figura 4.8. Los mutantes TSC2 K599M y TSC2 K106Q presentan una modulación diferencial de la vía de mTORC1. Las células HEK 293T fueron co-transfectadas de manera transitoria con Flag-SIRT1 y TSC2 WT, K599M (A) o K106Q (B). Al día siguiente fueron cambiadas de medio, y un día después fueron sometidas a un tratamiento con NAM o RESV (2h), para el posterior análisis por WB de la ruta mTORC1. Todos los blots son representativos de al menos tres experimentos diferentes, y los correspondientes ratios (P-p70/p70 total) están representados en los histogramas de barras expresados con la media \pm S.D. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. sin diferencia significativa.

A continuación decidimos estudiar el estado de acetilación/desacetilación de la proteína TSC2 en estos mutantes. Para ello, realizamos una IP de las lisinas acetiladas en condiciones basales, y WB frente a la proteína TSC2. La acetilación disminuyó en ambos mutantes (TSC2 K106Q y TSC2 K599M) en comparación con el TSC2 WT, lo cual indicó que estos residuos estaban modulados por acetilación (Figura 4.9). Además, se observó un incremento en la ubiquitinación de TSC2 en el mutante mimético de acetilación (TSC2 K106Q) comparado con el TSC2 WT. Por el contrario, el mutante TSC2 K599M presentó un menor grado de ubiquitinación (similar al TSC2 WT) (Figura 4.9).

Con el objetivo de analizar la estabilidad de estos mutantes, co-transfectamos de manera transitoria las células HEK 293T con las proteínas recombinantes Flag-SIRT1 WT y TSC2 WT, K106Q o K599M. Después de 24 horas, se cambió el medio por medio completo y 24 horas después, las células fueron tratadas con cicloheximida durante 2 y 4 horas. El mutante de TSC2 mimético de acetilación (K106Q) presentó una menor estabilidad (40% a las 4 horas) en comparación con el mutante TSC2 K599M y su control TSC2 WT (100% transcurridas 4 horas) (Figura 4.9).

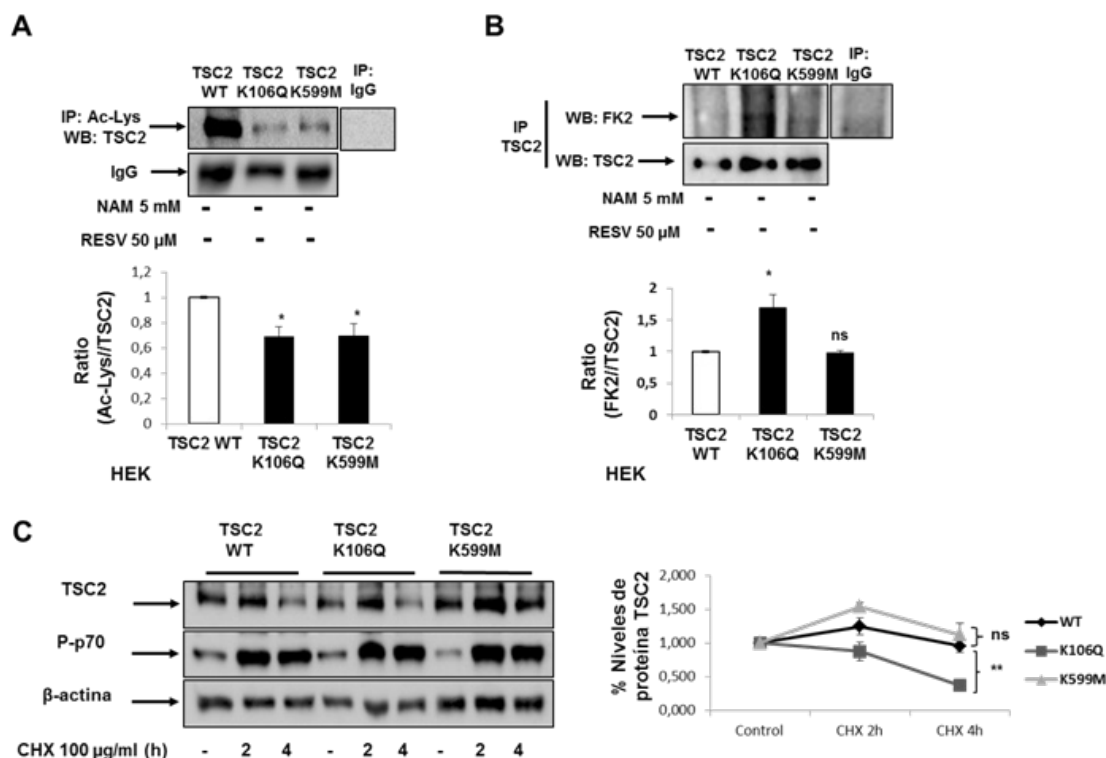


Figura 4.9. Los mutantes de TSC2 (K106Q y K599M) presentan un menor grado de acetilación de TSC2, y el mutante mimético de acetilación (K106Q) muestra un mayor grado de ubiquitinación y menor estabilidad, en comparación con TSC2 WT o TSC2 K599M. (A) Se realizaron inmunoprecipitaciones de las lisinas acetiladas procedentes de los extractos celulares controles del experimento anterior, y WB frente a la proteína TSC2 para ver el estado de acetilación de la proteína. (B) De los mismos extractos (controles) se comprobó el estado de ubiquitinación de la proteína TSC2 mediante IP del TSC2 y WB de FK2. (C) Análisis de la expresión de la proteína TSC2 en las células HEK transfectadas con TSC2 WT, K106Q o K599M, y tratadas con CHX durante 2 o 4 horas. Todos los blots son representativos de tres experimentos independientes (n=3), y los gráficos están expresados como la media \pm S.D. *P<0.05; ** P<0.01; n.s. sin diferencia significativa con respecto al TSC2 WT.

Asimismo, nos planteamos si estos mutantes de TSC2 presentaban una diferente regulación de la autofagia en respuesta a NAM o RESV. En primer lugar, observamos que el ratio LC3B-II/ β -actina aumentó en respuesta a RESV en los casos de TSC2 WT y TSC2 K599M. Sin embargo, encontramos una reducción en el ratio LC3B-II/ β -actina en el mutante TSC2 K106Q (Figura 4.10). En segundo lugar, las células fueron sometidas o no a un pretratamiento con cloroquina, y a continuación, se estimularon o no con RESV. El análisis por WB de LC3B-II/ β -actina reveló que existía un flujo autofágico positivo en los casos de TSC2 WT y TSC2 K599M, y un bloqueo en el flujo en los experimentos con TSC2 K106Q (Figura 4.10).

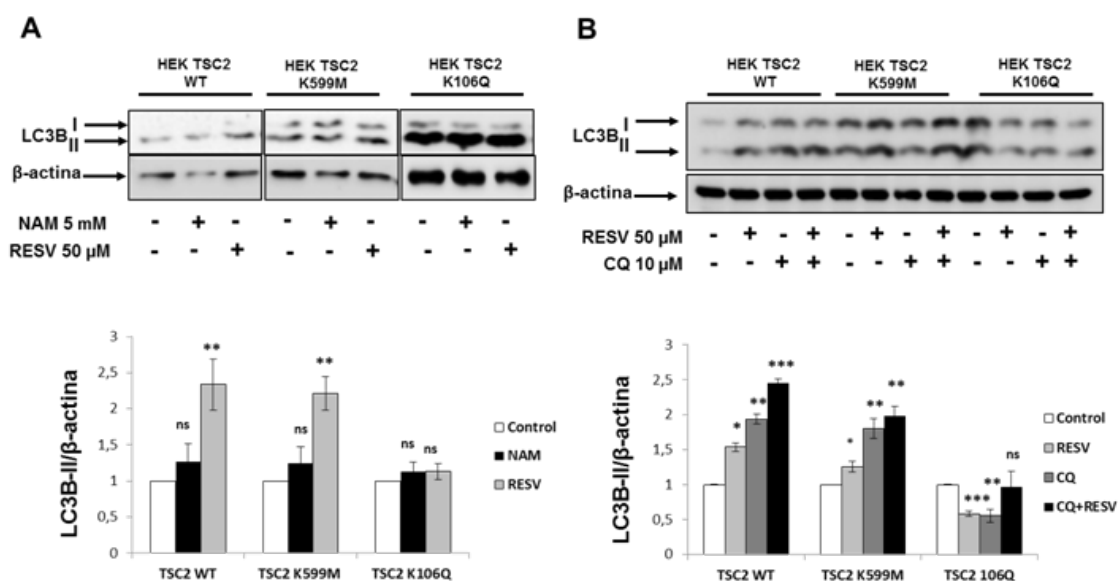


Figura 4.10. El mutante TSC2 K106Q presenta un bloqueo en la activación de la autofagia en respuesta a RESV. Las células co-transfectadas transitoriamente con Flag-SIRT1 y TSC2 WT, TSC2 K106Q o TSC2 K599M, fueron cambiadas de medio al día siguiente, y transcurridas 24 horas, fueron estimuladas durante 2 horas con NAM y RESV en (A), o pretratadas o no con cloroquina (19 horas) y tratadas o no, con RESV (durante las dos últimas dos horas) (B). Los extractos proteicos fueron recogidos para el posterior análisis por WB de los niveles de LC3B-II/β-actina. Los gráficos están expresados como la media ± S.D. (n=3). *P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001, n.s. sin diferencia significativa con respecto al TSC2 WT.

4.1.4 Modulación de la señalización de mTORC1 y la autofagia por modulación de la actividad desacetilasa de SIRT1

Con el objetivo de explorar la modulación de la vía de señalización de mTORC1 y la autofagia, sometimos a las células MIN6 a diferentes dosis de NAM o RESV. En respuesta a RESV, observamos una reducción de la activación de mTORC1 de manera dosis dependiente, y una activación simultánea de la forma lipidada de LC3B (LC3B-II), es decir, una activación del proceso de autofagia. La estimulación con NAM, de manera contraria, incrementó la actividad de mTORC1 de manera dosis dependiente, y no se detectó aumento de LC3B-II (Figura 4.11).

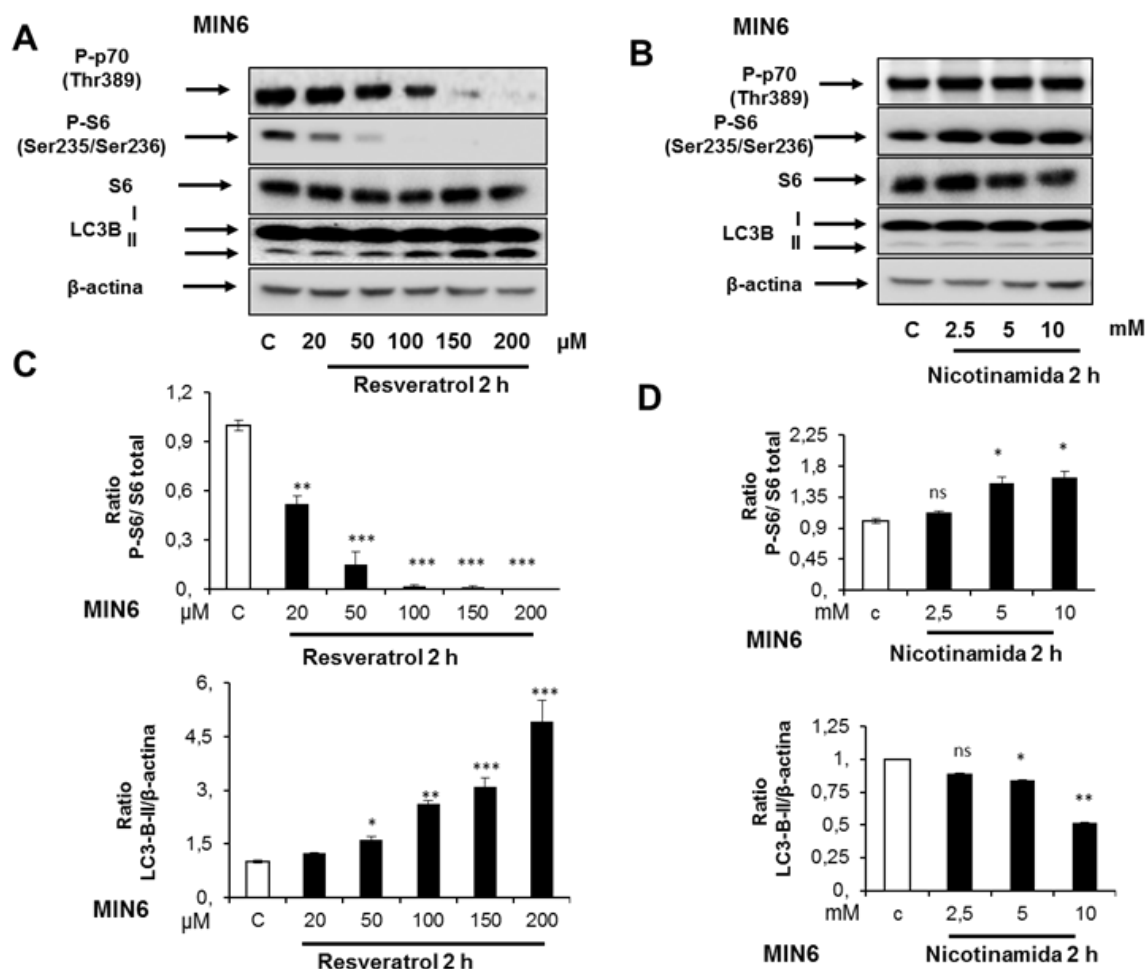


Figura 4.11. La nicotinamida estimula, y el resveratrol inhibe la señalización de mTORC1, modulando la autofagia de manera dosis dependiente. Las células MIN6 fueron cultivadas en medio completo, y al día siguiente de la siembra del experimento, se trataron con las concentraciones indicadas de RESV (A) o NAM (B) durante 2 horas. Los blots y su correspondiente cuantificación está recogida en los histogramas que representan los ratios P-S6/S6total y LC3B-II/ β -actina de la dosis respuesta del RESV (C) o NAM (D) expresados como la media \pm S.D. (n=3). *P<0.05; ** P<0.01, *** P<0.001; n.s. sin diferencia significativa con respecto al control (células sin tratar).

También se obtuvieron resultados similares con experimentos de curvas de tiempo (de 15 minutos a 4 horas) en respuesta a los agonistas, NAM (5mM) y RESV (50 μ M). Ambos, modulan la ruta de mTORC1 y la autofagia a todos los tiempos en las células MIN6 y HEK 293T (Figura 4.12).

Asimismo, analizamos los efectos de NAM y RESV sobre la regulación del flujo autofágico. Las células MEF fueron transfectadas de manera estable con el plásmido GFP-LC3B, y al día siguiente de la siembra del experimento, fueron pre-tratadas con cloroquina (CQ) a una concentración de 10 μ M, y 13 horas después, se sometieron a un tratamiento con NAM o RESV durante 2 horas. La cloroquina es un agente lisosomotrópico que bloquea la formación de autofagolisosomas por aumento del pH lisosomal, lo que conduce a una inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, así como de la degradación de las proteínas lisosomales. Cuando el flujo autofágico es efectivo, la proteína LC3B se degrada más rápidamente que GFP, permitiendo su liberación y detección de GFP libre en el WB. La cloroquina aumentó tanto el marcador autofágico LC3B-II como el GFP libre. Con el tratamiento de la NAM no se observaron

cambios ni en la expresión de LC3B-II ni en el GFP libre. Sin embargo, el RESV aumentó aún más el GFP libre tanto en ausencia como en presencia de CQ (Figura 4.12). Estos datos indican que el RESV es un potente inductor del flujo autofágico.

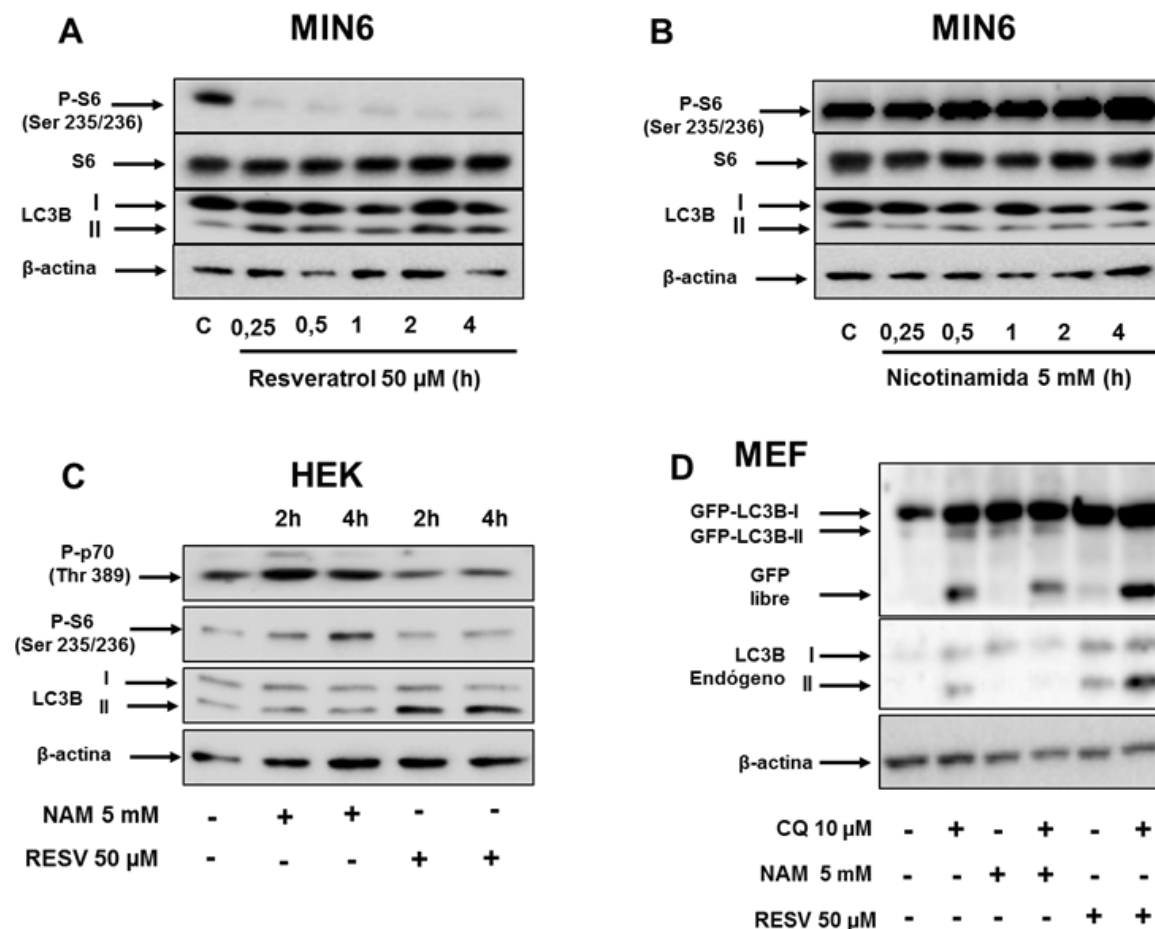


Figura 4.12. El resveratrol inhibe, y la nicotinamida estimula la señalización de mTORC1, modulando la autofagia a diferentes tiempos. Las células MIN6 fueron cultivadas en medio completo, y al día siguiente de la siembra del experimento, se trataron con las concentraciones indicadas de RESV (A) o NAM (B) de 15 minutos a 4 horas. (C) Blots representativos de una pequeña curva de tiempo (2 y 4 horas) en las células HEK 293T. (D) Las células MEFs que expresan de manera estable la proteína de fusión GFP-LC3B, fueron estimuladas o no con cloroquina (10 μM) durante 15 horas, y las dos últimas horas con/sin NAM o RESV. Los niveles de la proteína LC3B, así como del GFP libre, fueron analizados por WB.

En la literatura, hay numerosos trabajos que demuestran que el RESV es un potente inductor de la vía AMPK, debido al aumento del AMPc intracelular por inhibición de las fosfodiesterasas (Chung, 2012) (Hu, 2016). En nuestras manos, el RESV también activa la vía AMPK por incremento en la fosforilación de la treonina 172, en todas las líneas celulares usadas en este estudio.

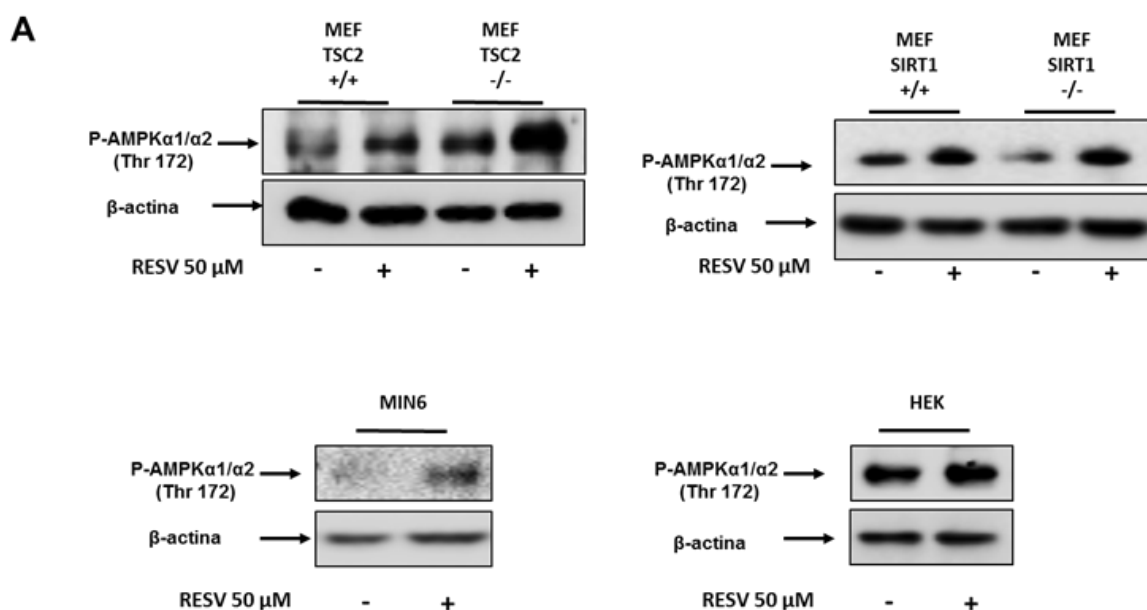


Figura 4.13. El RESV activa la vía de AMPK en todas las líneas celulares. Se analizó la fosforilación de la treonina 172 de la AMPK. Este residuo se encuentra en el lazo de activación de la AMPK, y su fosforilación es necesaria para la activación de la misma. El tratamiento con RESV durante 2 horas activa la fosforilación de la AMPK en todas las líneas celulares.

4.1.5 Los efectos de NAM y RESV sobre la modulación de mTORC1 y la autofagia son dependientes de TSC2

Para confirmar el papel de la proteína TSC2 en el control de la ruta de mTORC1 y la autofagia, realizamos los mismos tratamientos de NAM o RESV en las células β pancreáticas MIN6 Scr y *TSC2 shRNA*, así como en los MEF *Tsc2* +/+ y *Tsc2* -/-. La estimulación con NAM indujo la ruta de mTORC1, e inhibió la autofagia en las células MIN6 Scr y en los MEF *Tsc2* +/+, mientras que el tratamiento con RESV disminuyó la ruta de mTORC1 y estimuló el marcador autofágico LC3B-II en las mismas líneas celulares. Sin embargo, la eliminación de la proteína TSC2 (MIN6 TSC2 shRNA y MEF *Tsc2* -/-) causa una hiperactivación basal de la ruta de mTORC1, asimismo, se pierden los efectos de los tratamientos con NAM y RESV sobre la modulación de la actividad de mTORC1 y la respuesta autofágica (Figura 4.14). Estos datos sugieren que la proteína TSC2 es necesaria para observar los efectos de NAM y RESV sobre la modulación de la vía de mTORC1 y la autofagia.

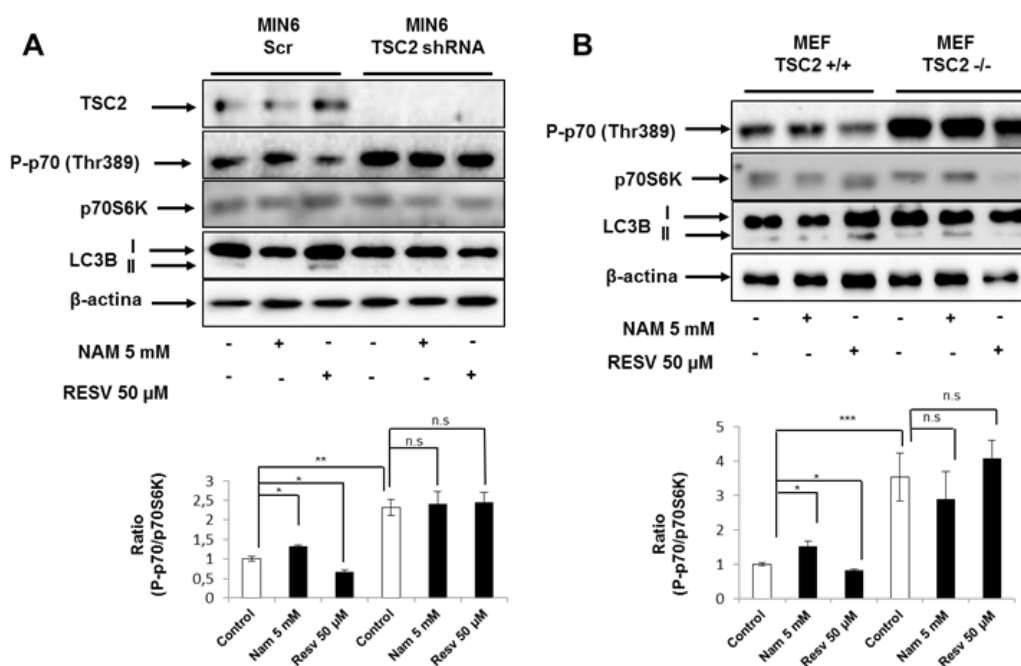


Figura 4.14. Papel esencial de TSC2 sobre la modulación de la vía de mTORC1 y la autofagia en respuesta a NAM y RESV en las células MIN6 y MEF. Se estimuló con NAM (5 mM) o RESV (50 μM) durante 2 horas y se analizó la actividad de la ruta mTORC1, así como la respuesta autofágica en las células MIN6 Scr y TSC2 shRNA (A), así como en los MEF TSC2+/+ y TSC2-/- (B). Los blots son representativos de tres experimentos diferentes, y los histogramas recogen los ratios P-p70 (T389)/p70 total representados como la media ± S.D. (n=3). *P<0.05; ** P<0.01, *** P<0.001; n.s. sin diferencia significativa con respecto a su control.

4.1.6 La modulación de TSC2/mTORC1 regula la proliferación celular.

Una gran parte de la investigación de nuestro grupo y de otros está centrada en profundizar en los mecanismos moleculares de toda una red de señalización centralizada en mTORC1, ya que ésta juega un papel esencial en la proliferación de las células β pancreáticas tanto *in vitro* (Bartolomé, 2010) (Bartolome, 2012) como *in vivo* (Bartolomé A. , 2014).

Por ello, decidimos profundizar en el papel del tratamiento con NAM (5 mM) y RESV (50 μM) durante 2 horas, en la línea celular β pancreática MIN6, así como en los MEF. Estas estimulaciones se llevaron a cabo en medio completo bajando la concentración de suero (de un 15 a un 2%). Se añadió un punto de tratamiento con rapamicina (40 nM), inhibidor específico de mTORC1, y clásico inductor de autofagia, como control positivo de inhibición de la proliferación. Al día siguiente se repitió el mismo procedimiento y se analizaron las células tras un tiempo de 24, 48 y 72 horas. El análisis por cristal violeta reveló que el tratamiento con NAM incrementó el número de células β pancreáticas desde 24 a 72 horas. De manera opuesta, el RESV, así como la RAPA redujeron el número de células (Figura 4.15). Resultados similares se obtuvieron con los mismos tratamientos a 48 h, en las células MEFs. Con el objetivo de confirmar este efecto sobre la proliferación, se hicieron experimentos de análisis de ciclo celular, tras la estimulación con los mismos tratamientos, por citometría de flujo. La NAM incrementó la población celular en fases S/G2/M. Sin embargo, el tratamiento con resveratrol produce un incremento en el número de células en fases S/G2/M, pero una reducción del número de células totales, lo cual

indica una parada del ciclo celular (Figura 4.15). Una posible explicación a este resultado puede ser una parada del ciclo celular para la activación de mecanismos de reparación de DNA, como es sugerido en otros trabajos.

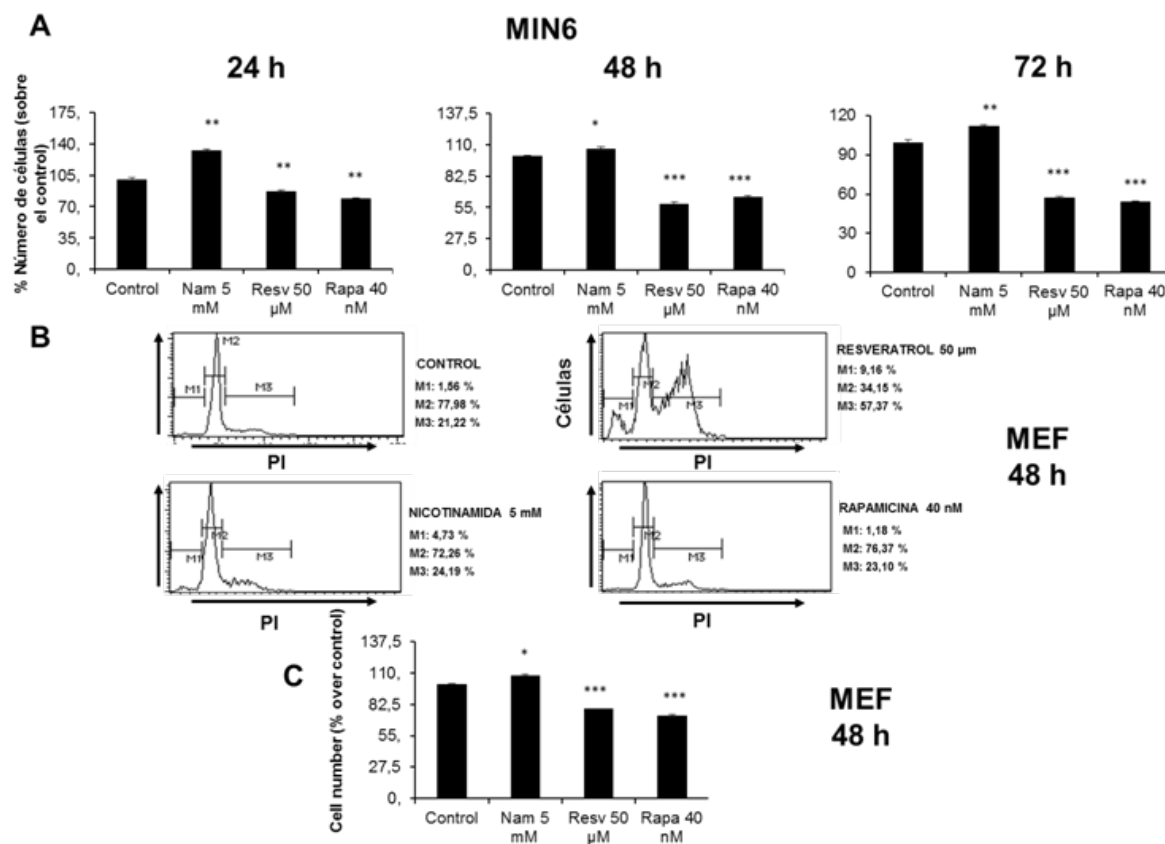


Figura 4.15. La NAM estimula, y el RESV bloquea la proliferación celular en las células MIN6 y MEF. (A-C) Las células fueron incubadas en su medio con baja concentración de FBS (2%) y fueron tratadas con NAM (5 mM), RESV (50 μ M) o RAPA (40 nM). A continuación, el medio se reemplazó por medio que contiene un 15% FBS (en el caso de las MIN6) ó 10% FBS (en el caso de los MEF). Al día siguiente este protocolo se repitió, y se analizó el número de células por un ensayo con cristal violeta (A). Los histogramas representan el porcentaje del número de células con respecto al control desde 24 a 72 horas. (B) Se analizó el contenido en DNA procedente del punto de 48 horas de las células MEF previamente fijadas, mediante un ensayo de tinción con yoduro de propidio (PI) y mediciones en el citómetro de flujo. (C) Histograma del porcentaje del número de células MEF (72 horas) con respecto al control. Los datos están representados como la media \pm S.D. (n=3). *P<0.05; ** P<0.01, *** P<0.001 con respecto a su control.

Para confirmar el papel de la regulación de la TSC2 mediada por acetilación sobre la modulación de la proliferación, realizamos experimentos de cristal violeta en las células transfectadas con los plásmidos de TSC2 (TSC2 WT, TSC2 K106Q y TSC2 K599M). El mutante TSC2 K106Q aumentó, y el TSC2 K599M disminuyó el número de células HEK y MIN6 de manera basal (Figura 4.16).

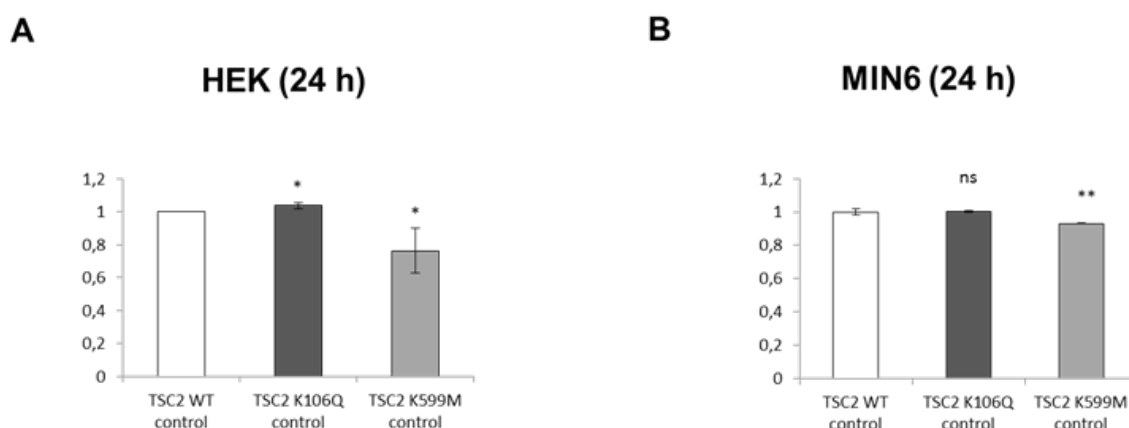


Figura 4.16. El mutante TSC2 K106Q activa y el TSC2 K599M disminuye la proliferación celular en las células HEK y en las MIN6. Las células transfectadas con TSC2 WT, TSC2 K106Q y TSC2 K599M fueron incubadas en su medio con baja concentración de FBS (2%). Al día siguiente se analizó el número de células por un ensayo con cristal violeta. Los histogramas representan el porcentaje del número de células con respecto al TSC2 WT a 24 horas después del cambio de medio. Los datos están representados como la media \pm S.D. (n=3). *P<0.05; n.s. sin diferencia significativa con respecto a su control.

4.1.7 Interacción de TSC2 con otras proteínas

Con el objetivo de identificar otras proteínas asociadas con TSC2, se co-transfectaron transitoriamente las células HEK 293T con los plásmido V5-TSC2 A614 y Flag-SIRT1, y se cambió el medio por medio completo las 24 horas, seguido de una estimulación con NAM o RESV durante 2 horas a al día siguiente. Se purificó la proteína mediante el uso de cromatografía de afinidad en columna, y se analizó por WB la expresión de V5 en el volumen eluido, para corroborar dicha purificación (Figura 4.17).

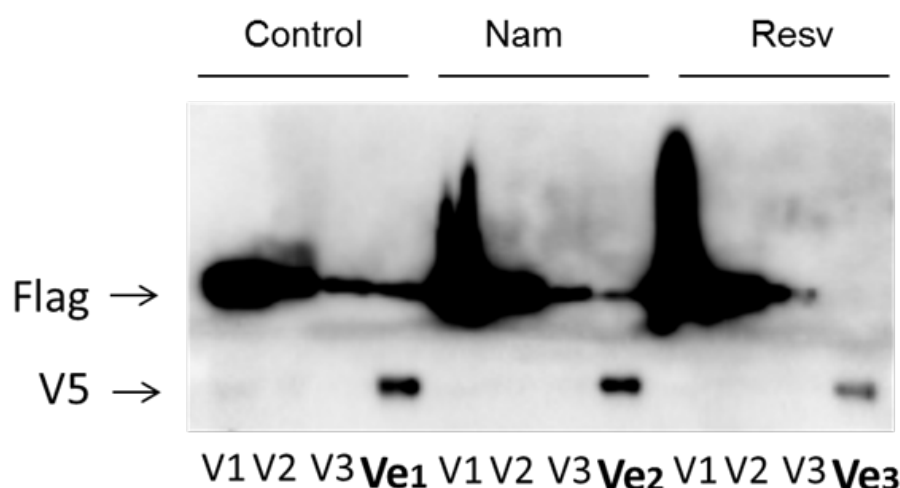


Figura 4.17. Purificación de V5 por el método de cromatografía de afinidad en columna. WB frente a Flag (SIRT1) y V5 (TSC2 A614). V1 (Volumen sin purificar), V2 (Volumen sin purificar eluido en el primer paso), V3 (volumen sin purificar eluido en el segundo paso), Ve (volumen eluido tras la purificación de V5) de las células control (Ve1), tratadas con NAM (Ve2) o RESV (Ve3).

A continuación, el volumen restante del volumen eluido tras la purificación, se analizó en el servicio de proteómica (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) para el estudio de las proteínas de interacción con TSC2. En la parte de la tesis de anexos se encuentran las tres tablas de resultados procedentes de los tres volúmenes de elución (anexos 2,3 y 4). Entre todas las proteínas que interaccionan con TSC2, se encuentran proteínas de la subunidad 40S y 60S del ribosoma, proteínas mitocondriales de shock térmico, glicoproteínas, subunidades de la ATP sintasa, ATP citrato sintasa, proteínas involucradas en el ciclo celular, proteínas de replicación y reparación del ADN, helicasas, proteínas asociadas a los telómeros y factores de iniciación o de elongación de la traducción.

4.2 Papel de la ruta TSC2/mTORC1 / p70S6K en la modulación de la respuesta autofágica y mitofágica inducida por desacoplamiento mitocondrial

4.2.1 La hiperactivación de la ruta mTORC1 causada por la eliminación de TSC2, impide la respuesta autofágica mediada por un daño oxidativo.

La ruta mTORC1/p70S6K regula negativamente la autofagia (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004), por lo tanto, cabe esperar que la hiperactivación crónica de esta ruta debido a la delección de TSC2 pueda llevar a una actividad autofágica deficiente.

Un trabajo del grupo de Koyanagi (Koyanagi 2011) demostró que los animales en los cuales se había delecionado la proteína TSC2 de manera específica en la célula β (β TSC2^{-/-}), presentaban un aumento en la masa mitocondrial en estas células, principalmente debido a una hiperactivación crónica de la ruta mTORC1, que conducía a un incremento en la biogénesis mitocondrial por regulación positiva de PGC1 α . En nuestras manos, las células MEF Tsc2^{-/-} también presentan un aumento en la expresión de los genes de biogénesis mitocondrial (PGC1 α y PGC1 β), así como un incremento en la expresión de la proteína PGC1 α (Figura 4.18).

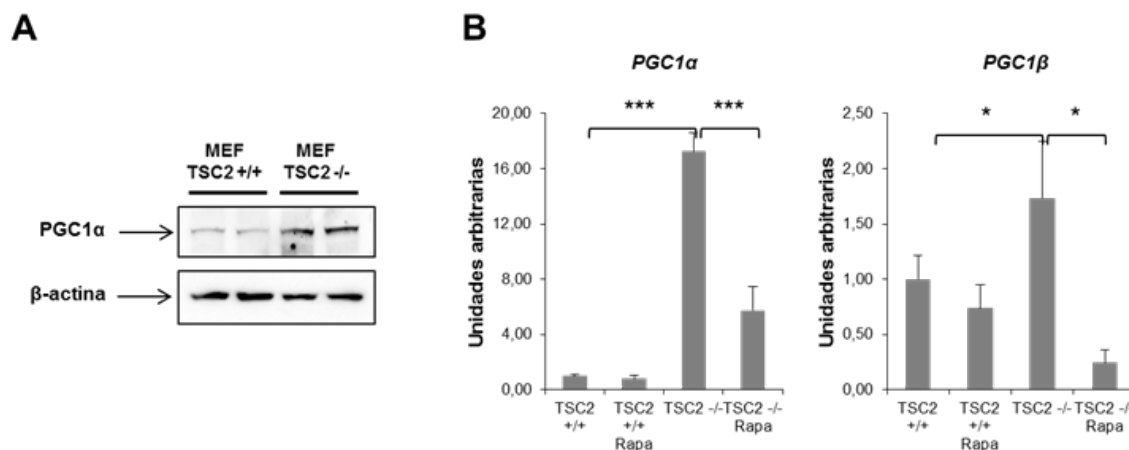


Figura 4.18. Aumento de la biogénesis mitocondrial en las células MEF *Tsc2*^{-/-}. (A) Análisis por WB de la expresión de la proteína de biogénesis mitocondrial (PGC1α) de las células MEF *Tsc2*^{+/+} y *Tsc2*^{-/-}. (B) Estudio por qPCR de los genes PGC1α y PGC1β, relativizados con el gen de la β-actina. Los datos están representados como la media ± S.D. (n=3). *P<0.05; *** P<0.001 con respecto a su control.

Otro trabajo, esta vez de nuestro grupo (Bartolome, A., 2014), evidenció que este modelo (*βTSC2*^{-/-}) presentaba una menor degradación mediada por autofagia de las mitocondrias (mitofagia) en la célula β. Asimismo, un gran porcentaje de las mitocondrias de este animal presentan un potencial de membrana mitocondrial colapsado, y una mayor co-localización con p62 en comparación con el ratón WT. Todos estos datos *in vivo* sugerían que el modelo animal *βTSC2*^{-/-} presentaba un flujo autofágico y mitofágico alterado. Por lo que nos propusimos profundizar en la causa de por qué estaban fallando estos procesos, mediante su análisis *in vitro*.

Para lograr este objetivo, usamos el agente inductor de mitofagia carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) en los MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-}. El CCCP inhibe la fosforilación oxidativa y provoca un desacoplamiento del potencial de membrana mitocondrial, lo que resulta en una degradación de dichas mitocondrias.

Inicialmente hicimos una curva de tiempo en respuesta a CCCP (20 μM) en los MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-}, y lo primero que observamos fue un incremento en el número de autofagosomas (marcador LC3B-II) en los MEF *TSC2*^{-/-}, de manera basal, con respecto a los MEF *TSC2*^{+/+}. En respuesta a CCCP, en los MEF *TSC2*^{-/-} observamos una pérdida de la inhibición de mTORC1, una menor lipidación de LC3B, así como una mayor acumulación de la proteína adaptadora p62/SQSTM1. Esto es una prueba de que los sustratos marcados para la degradación por autofagia no están siendo eficazmente eliminados en los lisosomas en las células deficientes de *TSC2* (Figura 4.19).

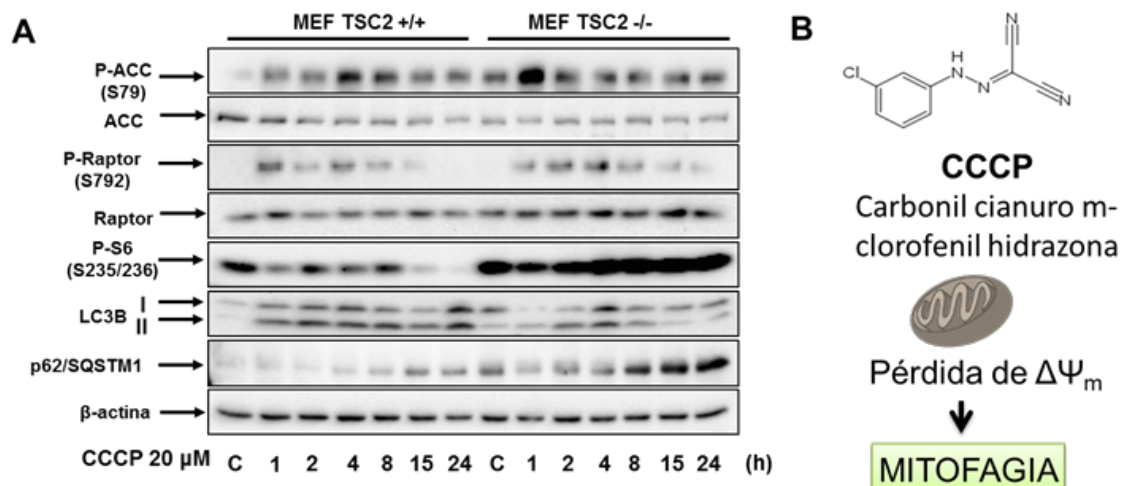


Figura 4.19. Defecto en la inducción de la autofagia y mayor acumulación de proteínas mal plegadas en respuesta a CCCP en los MEF TSC2^{-/-} debido a la hiperactivación de mTORC1. (A) Las células MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-} fueron estimuladas en su medio completo con CCCP (20 μM) a diferentes tiempos al día siguiente de ser sembradas. Las dianas de AMPK (ACC y Raptor) son fosforiladas en respuesta a CCCP. Los blots son representativos de tres experimentos diferentes. (B) Molécula de CCCP y mecanismo de inducción de mitofagia.

4.2.1 Las células carentes de TSC2 presentan un aumento en las proteínas mitocondriales oxidadas y envejecidas, debido a un defecto en la activación de la mitofagia.

Para comprobar nuestras hipótesis, realizamos inmunofluorescencia de mitocondrias marcadas con TOM20 y LC3B en condiciones basales y en respuesta a un daño mitocondrial (CCCP 20 μM, 2h). Lo que observamos fue que en respuesta a CCCP, las células TSC2^{-/-} tienen una menor capacidad de activación de la respuesta mitofágica (Figura 4.20).

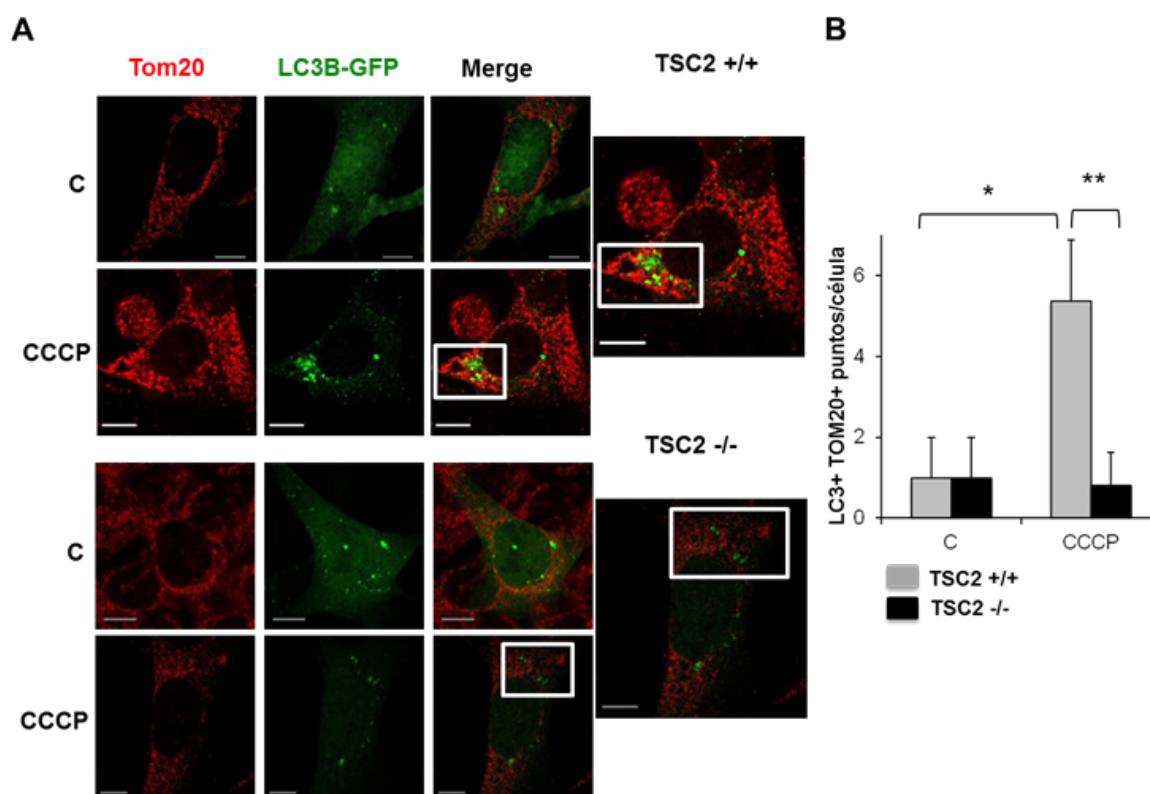


Figura 4.20. Los MEF TSC2^{-/-} presentan un defecto en la inducción de mitofagia tras un daño mitocondrial (A) Imágenes tomadas del microscopio confocal de inmunofluorescencia de las células MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-} (en respuesta o no a CCCP 20 μ M, 2h) marcadas con Tom20 (rojo) y LC3B-GFP (verde). (B) Histograma que representa las mitocondrias marcadas con LC3 (positivos para ambos marcajes) por célula en los MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-} (a la derecha del panel). *P<0.05; ** P<0.01.

En paralelo, realizamos experimentos de microscopía confocal en las células MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-} para estudiar de manera específica la mitofagia, llevando a cabo inmunofluorescencia de Tom20 (marcador estructural de mitocondrias) y p62/SQSTM1 (proteína de unión a ubiquitina). En condiciones basales, observamos que las células TSC2^{-/-} presentan una mayor colocalización de proteínas mitocondriales marcadas con p62 (color amarillo). El tratamiento con rapamicina en las células TSC2^{-/-} disminuyó considerablemente tanto los niveles basales de p62/SQSTM1 como su colocalización con las mitocondrias (Figura 4.21). Estos resultados van en concordancia con otros datos obtenidos en las células MIN6 TSC2^{shRNA}, en los cuales observamos un incremento en la oxidación y nitración de las proteínas mitocondriales, y una disminución de las mismas en respuesta a rapamicina (Bartolomé A. , 2014) (Figura 4.21).

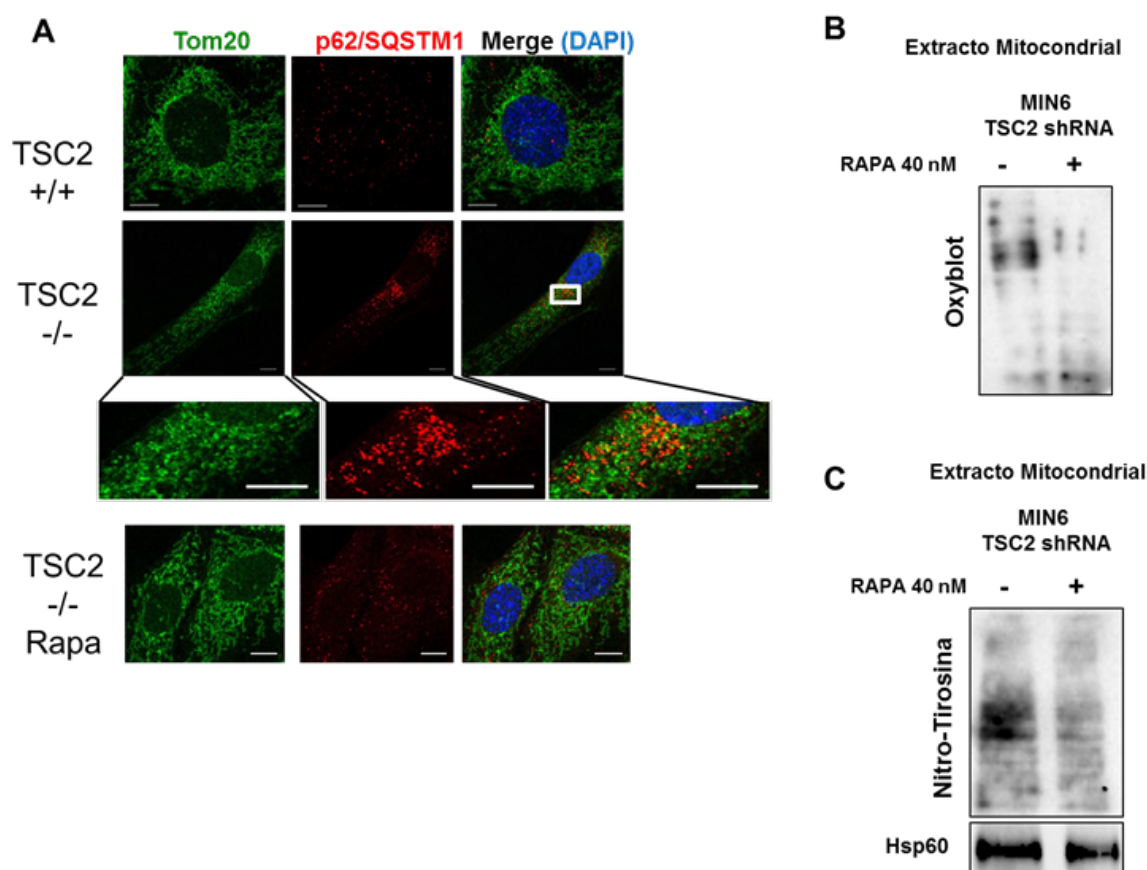


Figura 4.21. Aumento en las mitocondrias marcadas con p62 y en la oxidación y nitración de las proteínas mitocondriales en las células con hiperactivación de mTORC1 debido a una deficiencia en la proteína TSC2 (MEF TSC2^{-/-} y MIN6 TSC2shRNA), que disminuye en respuesta a rapamicina. (A) Imágenes tomadas del microscopio confocal de inmunofluorescencia de las células MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-} (sin y con rapamicina 40 nM 24 h) marcadas con el marcador mitocondrial Tom20 (verde) y p62/SQSTM1 (rojo). (B-C) Aislamiento de mitocondrias para la detección de proteínas mitocondriales oxidadas (B) y nitradas (C) de las células MIN6 TSC2shRNA (sin tratar o tratadas con rapamicina).

Para corroborar la hipótesis de que las células deficientes en TSC2 presentaban un impedimento en el aclaramiento autofágico de mitocondrias, realizamos un ensayo de MitoTimer, que permite monitorizar el reciclaje mitocondrial (Hernández, 2013). Esta proteína MitoTimer está formada por una proteína mitocondrial unida a Timer, que es una proteína fluorescente que cambia de fluorescencia verde a roja durante el transcurso del tiempo de 48 horas. La expresión de MitoTimer está controlada por el elemento de respuesta a tetraciclinas (TRE) como el pTRE-tight, en conjugación con el transactivador reverso de tetraciclinas (rtTA3). Tras un pulso de doxicilina (estimulación durante 1 hora), y tras varios lavados de las células con su medio de cultivo, se recogió la fluorescencia verde y roja a 12 y a 24 horas. Este ensayo reveló que las células MEF TSC2^{-/-} presentan un incremento en el ratio rojo/verde después de las 24 horas de la estimulación con doxicilina, en comparación con sus controles MEF TSC2^{+/+} (Figura 4.22). Estos resultados indican que estas células presentan un mayor envejecimiento de las proteínas mitocondriales, lo que creemos que es debido a un impedimento en el aclaramiento de mitocondrias.

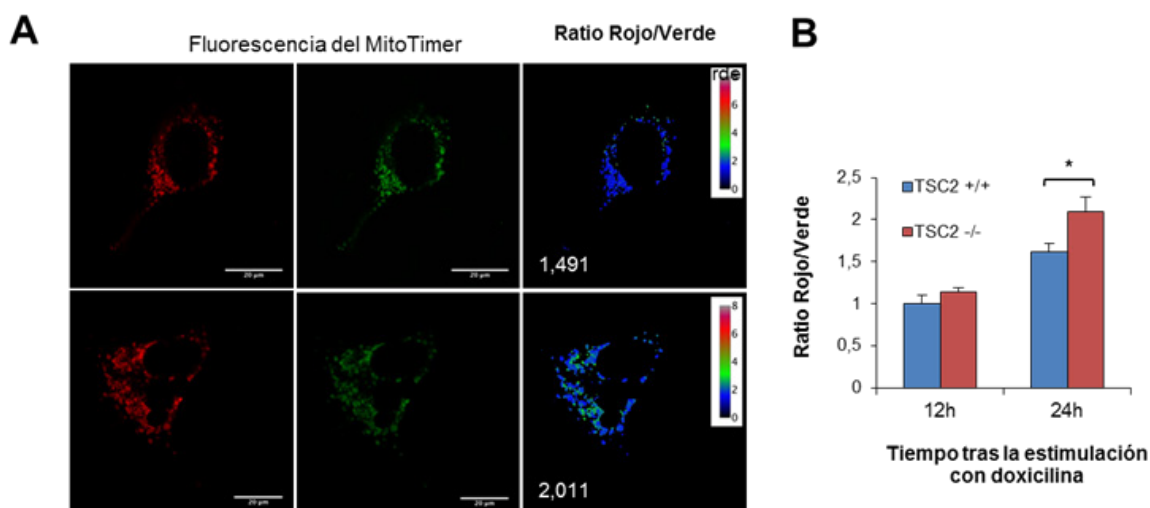


Figura 4.22. Análisis del envejecimiento mitocondrial mediante un ensayo de MitoTimer. (A) Se generaron células que expresan de manera estable rtTA3, fueron transfectadas con pTRE-tight-MitoTimer, y expuestas a doxiciplina durante 1h. A continuación, las células se lavaron tres veces con su medio, y se fueron tomando imágenes a 12 y a 24 h. (B) Histograma que representa el ratio rojo (mitocondrias envejecidas)/ verde (mitocondrias jóvenes) a 12 y a 24 horas en las células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- . *P<0.05.

4.2.3 Papel de TSC2/mTORC1 en la inducción de mitofagia mediada por CCCP.

A continuación, nos propusimos profundizar en el papel de la ruta TSC2/mTORC1 específicamente en la activación del proceso de mitofagia. Como ya sabemos, las mitocondrias desacopladas son rápidamente marcadas por proteínas de la maquinaria autofágica y degradadas en los autolisosomas.

En relación al mecanismo de señalización molecular que controla la mitofagia, se sabe que las mitocondrias con potencial de membrana mitocondrial normal son capaces de importar PINK1 a la matriz mitocondrial, donde es rápidamente procesada por la proteasa PARL, ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Por ello, los niveles de la proteína PINK1 completa son bajos en condiciones basales. De manera contraria, en respuesta a un daño mitocondrial, se disminuye el potencial de membrana mitocondrial y PINK1 es acumulado en la membrana mitocondrial externa, donde sufre su autofosforación (Jin, 2010). Estas modificaciones en PINK1 son importantes para el reclutamiento de Parkina (ubiquitin ligasa) y la inducción de mitofagia (Okatsu, 2012). Quisimos estudiar esta vía de señalización en nuestras células, y observamos que existían diferencias importantes entre las células TSC2+/+ y las TSC2-/- . En las células MEF TSC2+/+ en respuesta a CCCP, observamos una respuesta esperada de disminución en la actividad de la ruta mTORC1 y un aumento en la activación de la macroautofagia. Asimismo, estas células eran capaces de acumular PINK1 en respuesta a CCCP. Sin embargo, las células MEF TSC2-/- además de presentar un mantenimiento en la actividad de mTORC1 y un impedimento en la activación de la macroautofagia tras un tratamiento con CCCP, también presentaban una incapacidad en la acumulación de la proteína PINK1 tras estimulaciones a diferentes tiempos con CCCP (Figura 4.23). Curiosamente, el tratamiento con rapamicina en estas células TSC2-/- no fue capaz de revertir la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial, pero si encontramos activación de la macroautofagia (aumento de la lipidación de LC3B). El análisis por

PCR cuantitativa (qPCR) del ARNm de *Pink1* indicaba que la rapamicina era capaz de inducir de manera muy significativa los niveles de ARNm de *Pink1* y sin un incremento mayor tras la estimulación con CCCP. Estos resultados sugieren que TSC2 presenta un papel regulador positivo de la expresión génica de *Pink1*, y que las células deficientes de TSC2 muestran un defecto cuantitativo (posiblemente a nivel transcripcional) en la acumulación de PINK1 (Figura 4.23).

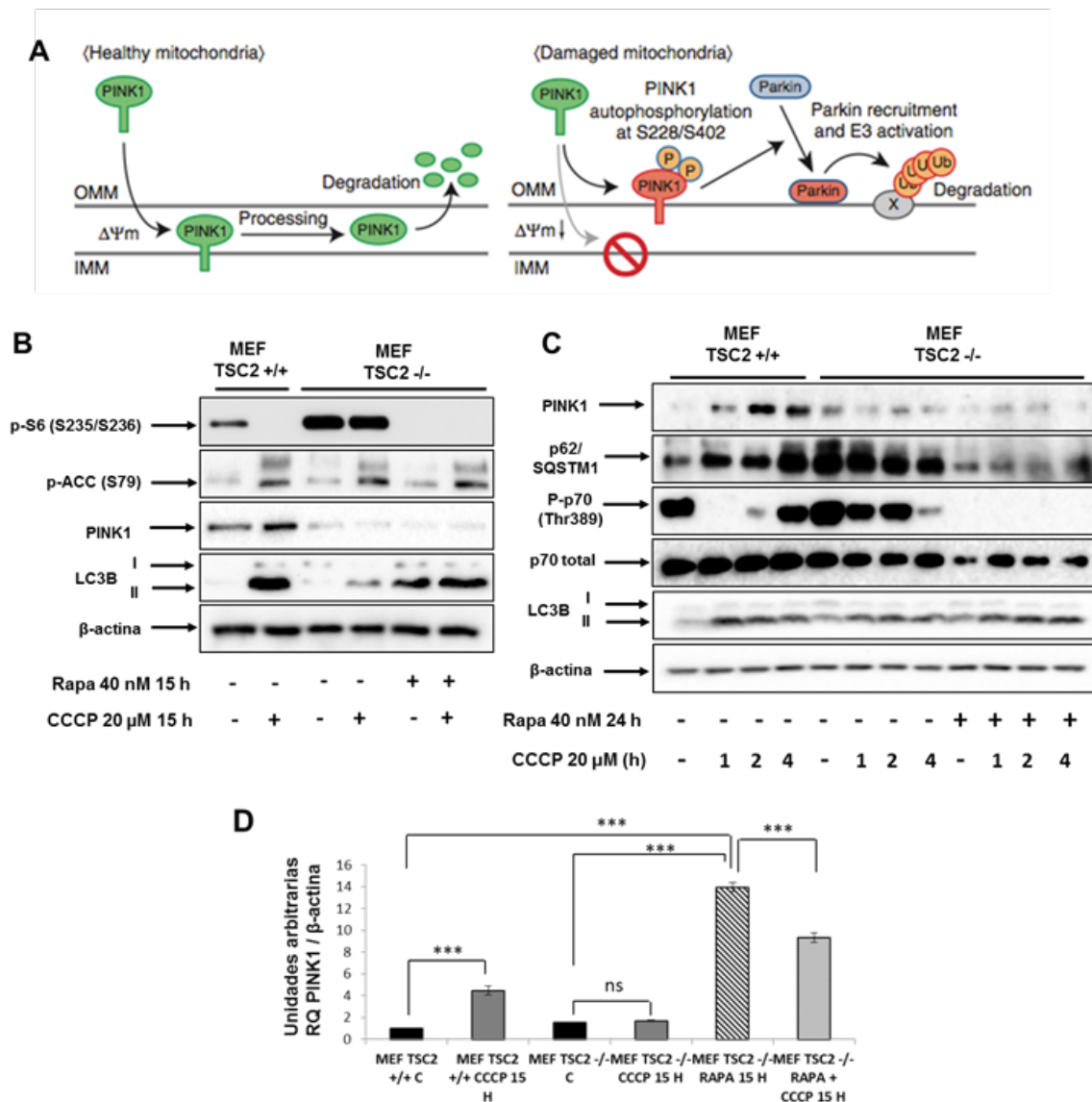


Figura 4.23. Defecto en la acumulación de PINK1 en la membrana externa mitocondrial tras la pérdida de potencial mitocondrial en respuesta a CCCP, en los MEF TSC2-/-. (A) Esquema del modelo de reclutamiento de Parkin tras un daño mitocondrial propuesto en el trabajo de Okatsu K., Nature Communications, 2012. (B-D) Las células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- fueron estimuladas con CCCP (20 μM) a tiempos largos (B) y cortos (C), así como la rapamicina (40 nM) en los TSC2-/- . Los blots son representativos de tres experimentos diferentes. (D) Histograma que muestra los niveles de ARNm de PINK1/β-actina en las células MEF TSC2+/+ vs TSC2-/- representados como la media ± S.D (n=3). *** P<0.001; n.s. sin diferencia significativa con respecto a su control.

Asimismo, quisimos continuar profundizando en la vía de señalización. En concreto, quisimos analizar el papel que tenía la proteína Parkina en dicho proceso. Para ello, generamos líneas celulares MEF TSC2 +/+ y TSC2 -/- que expresaban de manera estable pRK5-HA-Parkina, lo que nos permitió analizar tanto la expresión como la localización de dicha proteína. En condiciones basales, la proteína Parkina se localiza en el citoplasma independientemente de la actividad de

mTORC1, y no encontramos colocalización con las mitocondrias ni en las células control, ni en las deficientes de TSC2, ni incluso en las *TSC2* $-/-$ tratadas con rapamicina. En respuesta a CCCP, las células carentes de TSC2 presentan una cantidad muy inferior de mitocondrias marcadas con Parkina, en comparación con las células control (Figura 4.24). Este resultado se puede explicar debido al defecto en la acumulación de PINK1 en estas células. Sin embargo, este impedimento no es total, ya que algunas pocas células sí que presentaban colocalización de HADHA con PARK2 a tiempos más largos. Además, el tratamiento con rapamicina en las células deficientes de TSC2 es capaz de revertir dicho defecto. Por otro lado, la sobreexpresión de Parkina en las células *TSC2* $-/-$ permite una mayor respuesta macroautofágica en estas células, de manera independiente a la acumulación de PINK1 (Figura 4.24). Estos resultados apuntan a que podría existir una acumulación de PARK2 independiente de PINK1, o bien, podría existir otro mecanismo alternativo en estas células por el cual no somos capaces de ver dicha acumulación.

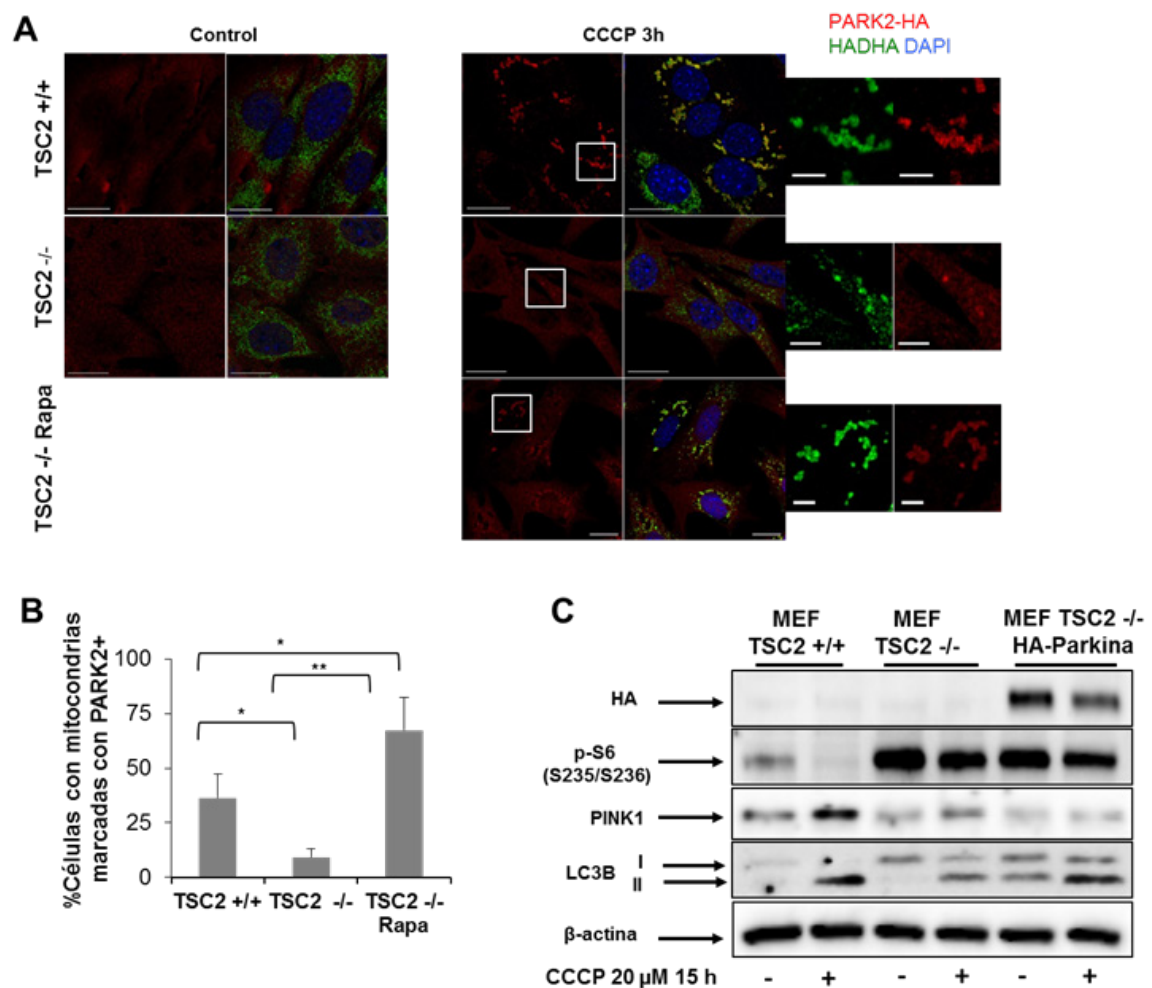


Figura 4.24. Impedimento en la translocación de Parkina (PARK2) en las células deficientes de TSC2 en respuesta a CCCP. (A) Se generaron células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- que expresaban de manera estable PARK2-HA para analizar la localización de Parkina por microscopía confocal. La rapamicina se usó a una concentración de 40 nM durante 15h. El CCCP fue usado a 20 μ M durante 3 horas. Las barras indican 20 μ m y en las imágenes ampliadas representan 50 μ m. (B) Cuantificación del porcentaje de células con mitocondrias marcadas con PARK2, y representadas como la media \pm S.D (n=3). *P<0.05; **P<0.01. (C) Las células MEF TSC2-/- fueron transfectadas de manera transitoria con HA-Parkina, así como sus controles MEF TSC2-/- y los MEF TSC2+/+ fueron tratados con CCCP, para su posterior análisis por western-blot. Los blots son representativos de tres experimentos diferentes.

La degradación de proteínas de la matriz mitocondrial y de la membrana interna mitocondrial es dependiente absolutamente de la mitofagia. Sin embargo, las proteínas de membrana externa mitocondrial, como por ejemplo la Parkina, son llevadas para su degradación al proteasoma tras un desacoplamiento mitocondrial, y su eliminación es independiente de mitofagia. Por ello, analizamos la expresión (tanto por inmunofluorescencia como por *western blot*) de una proteína de la matriz mitocondrial denominada HADHA (hidroxiacil CoA deshidrogenasa) que interviene en el paso de oxidación por NAD⁺ de la β -oxidación de los ácidos grasos. Las células MEF *TSC2*^{+/+} y las MEF *TSC2*^{-/-} estimuladas con rapamicina presentan una mayor desaparición de la fluorescencia de HADHA tras una estimulación prolongada con CCCP (20 horas) en comparación con las células MEF *TSC2*^{-/-} control, y una reaccumulación de HADHA en las células pretratadas con cloroquina (inhibidor de la autofagia). Sin embargo, las células MEF *TSC2*^{-/-} presentan un defecto en la desaparición de la fluorescencia de HADHA tras la estimulación con CCCP (Figura 4.25). Estos resultados fueron confirmados por *western-blot*, viéndose un mantenimiento de los niveles de HADHA, así como una acumulación de p62/SQSTM1, tras la estimulación con CCCP, en las células MEF *TSC2*^{-/-}. Sin embargo, cuando estas células son tratadas con rapamicina, disminuye los niveles de HADHA tras la estimulación con CCCP. Dicho tratamiento con rapamicina también previene de la acumulación de p62/SQSTM1 (Figura 4.25).

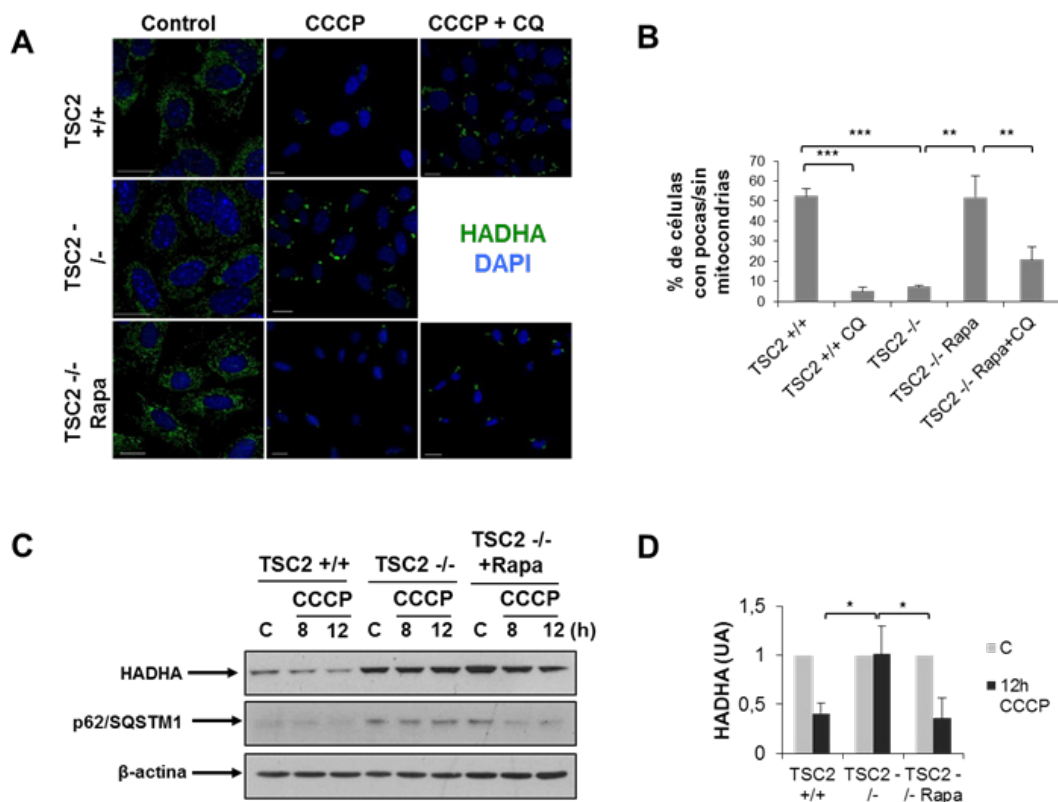


Figura 4.25. Impedimento en la degradación de mitocondrias en los MEFs deficientes de TSC2, tras una estimulación con CCCP. (A) Imágenes tomadas del microscopio confocal de inmunofluorescencias de HADHA (verde) en las células MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-}, tras ser estimuladas con CCCP (20 μ M, 20h), o con un pretratamiento de cloroquina (10 μ M) más CCCP. La rapamicina se utilizó a 20 nM. (B) Cuantificación del número de células con pocas o sin mitocondrias tras la estimulación con CCCP, representados en el histograma como la media \pm S.D (n=3). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (C) Las células MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-} se estimularon con CCCP a los tiempos indicados, y se lisaron para su posterior análisis por western-blot. (D) Cuantificación de la expresión de la proteína HADHA por western-blot expresadas en unidades arbitrarias (AU) como la media \pm S.D. (n=3), * $P < 0.05$.

Por último, para recuperar la acumulación de PINK1 se reintrodujo la proteína TSC2 en las células MEF *TSC2*^{-/-}. Como esperábamos, las células MEF *TSC2*^{+/+} en respuesta a CCCP, eran capaces de acumular PINK1, inhibir mTORC1 y activar la autofagia. Por el contrario, se confirmó que el CCCP en las células MEF *TSC2*^{-/-} no indujo una acumulación de PINK1, ni tampoco inhibió la ruta de mTORC1, ni provocó una activación de la autofagia. Sin embargo, todos estos efectos se revirtieron al reintroducir la proteína TSC2. Estos resultados nos confirmaron que TSC2 presenta un papel esencial en la acumulación de PINK1, y por lo tanto, en la inducción de la mitofagia dependiente de PINK1 (Figura 4.26).

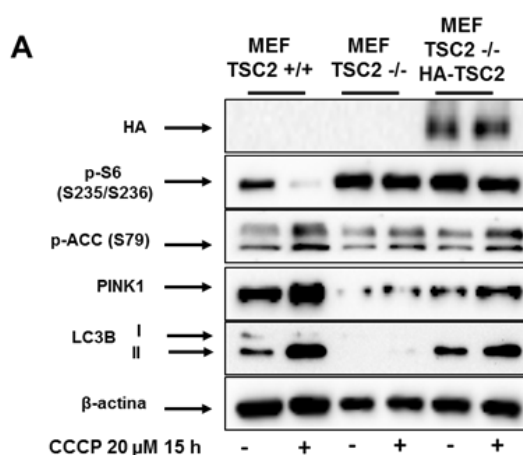


Figura 4.26. Reacumulación de PINK1 en las células MEF *TSC2*^{-/-} en las que se ha reintroducido la proteína TSC2. (A) Análisis de la expresión de la proteína PINK1 tras la reintroducción del plásmido HA-TSC2 en las células MEF *TSC2*^{-/-}, en condiciones basales y tras un tratamiento con CCCP.

4.2.4 La hiperactivación de mTORC1 causada por delección de TSC2 incrementa la actividad del proteasoma.

Por último, nos planteamos que la hiperactivación de mTORC1 causada por delección de TSC2, podría conducir a una actividad del proteasoma incrementada, como se indica en otro trabajo (Zhang, 2014), e inducir la degradación de PINK1. Esta idea podría explicar la menor translocación de PINK1 a la mitocondria en las células carentes de TSC2. Para corroborar esta hipótesis, sometimos a las células MEF *TSC2*^{+/+} y *TSC2*^{-/-} a un pretratamiento con o sin rapamicina, y al día siguiente, una estimulación con el inhibidor de la actividad del proteasoma (MG132) durante 2 horas, y CCCP las dos o tres horas posteriores. El análisis por WB reveló que el tratamiento con MG132 en las células MEF *TSC2*^{-/-} sin CCCP, incrementó los niveles de la proteína completa PINK1. Asimismo, se observó que el tratamiento con MG132 y CCCP en las células MEF *TSC2*^{-/-} indujo la acumulación de PINK1 (por WB) y la translocación de Parkina a la mitocondria (por inmunofluorescencia), en comparación con las que no se trataron con el inhibidor (Figura 4.27). Por último, el tratamiento con rapamicina, favoreció por un lado la translocación de Parkina a la mitocondria (en las células MEF *TSC2*^{-/-}, estimuladas con CCCP), y la acumulación de PINK1 (en células MEF *TSC2*^{-/-} en presencia de MG132, tratadas y sin tratar con CCCP) (Figura 4.27).

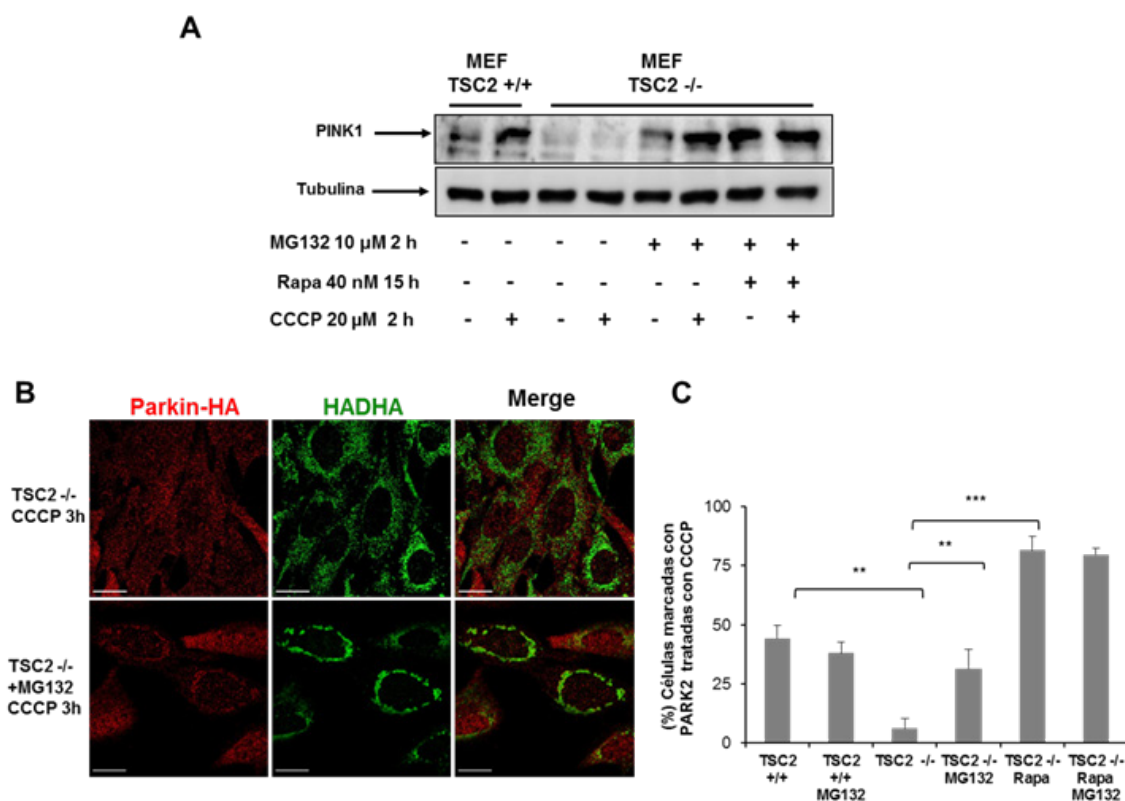


Figura 4.27. La expresión de PINK1 es dependiente de la inhibición de mTORC1. (A) Las células MEF TSC2 -/- fueron estimuladas con RAPA (15 h), seguidas de un tratamiento con MG132 (2 h) y a continuación, una estimulación con CCCP (2-3 h) en estas células, así como sus controles MEF TSC2 +/+. (B) Inmunofluorescencia de células MEF TSC2 -/- tratadas con CCCP (3h), en presencia o ausencia de MG132, marcadas con Parkina-HA (rojo) y HADHA (verde). (C) Las células que expresan de manera estable HA-PARK2 se sometieron a un tratamiento largo con RAPA (15 h), seguido de MG132 (2 h) y CCCP (las 3 últimas horas) y a continuación se realizó un análisis por microscopia confocal. Los resultados se expresan como la media \pm S.D (n=3-5). **P < 0.01, ***P < 0.001.

5 DISCUSIÓN



La vía de mTORC1/p70S6K tiene un papel esencial en la regulación de la síntesis de proteínas, proliferación celular, e inhibición de la autofagia, entre otras. El complejo de esclerosis tuberosa formado por las proteínas TSC1 y TSC2 controla negativamente la ruta de mTORC1. La proteína TSC2 tiene un dominio GAP, que activa la actividad GTPásica intrínseca de Rheb, favoreciendo la conversión de Rheb-GTP (activo) a Rheb-GDP (inactivo), e inhibiendo como consecuencia la activación de mTORC1 (Inoki, 2003). El complejo TSC1-TSC2 funciona como un nexo integrador de señales energéticas y nutricionales, y está altamente regulado por numerosas fosforilaciones procedentes de múltiples quinasas. Sin embargo, la regulación de TSC2 mediada por otro tipo de modificaciones post traduccionales, como por ejemplo, la acetilación en lisinas, está poco estudiada. En la literatura, el trabajo de Ghosh (Ghosh, 2010) evidenció por primera vez que la proteína TSC2 se encuentra asociada con la desacetilasa dependiente de NAD⁺, sirtuina1 (SIRT1), y que ésta modula la actividad de mTORC1. Sin embargo, no demuestran ninguna evidencia de que la proteína TSC2 se acetile, pero sugieren que probablemente ésta pueda sufrir acetilaciones en lisinas, en condiciones de crecimiento y altos niveles de energía, y que esto regule su actividad.

Nuestro trabajo ha persiguido dilucidar el papel de la acetilación en lisinas de TSC2 en la modulación de la vía de mTORC1, usando diferentes moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1 (nicotinamida y resveratrol) en varias líneas celulares. Por un lado, la nicotinamida (inhibidor alostérico de SIRT1) a dosis de 2,5/5/10 mM (desde 15 minutos hasta 4 horas), aumentó en todos los casos el estado de acetilación en lisinas de TSC2 en condiciones proliferativas. Además, observamos que la NAM aumentó la actividad de la vía de mTORC1, y la proliferación, e impidió la activación de la autofagia, en células β pancreáticas MIN6. Otros autores señalan que la NAM presenta efectos tanto activadores como inhibidores de SIRT1 y esto depende del ratio NAD⁺/NADH celular (Jang, 2012). Esto es debido a que la NAM inicialmente puede estar actuando como un activador de SIRT1 promoviendo la biosíntesis de NAD⁺ y la activación de SIRT1, sin embargo, el aumento en los niveles intracelulares de NAM, inhiben la acción desacetilasa de SIRT1. De hecho, los experimentos realizados en estimulación conjunta de NAM y visfatina (nicotinamida fosforribosiltransferasa), revelaron una disminución en la actividad de mTORC1 y una clara activación de la autofagia, es decir, que se asemejan a los resultados obtenidos en el caso de las células tratadas con RESV. Esto demuestra que la visfatina es capaz de convertir NAM en NAD⁺ intracelular, promoviendo la activación de SIRT1.

Por otro lado, nuestros resultados y otros trabajos de la literatura muestran que el resveratrol (potente activador de SIRT1) evita la acetilación en lisinas de TSC2 en condiciones de crecimiento y altos niveles de energía. Además, el RESV inhibe la vía de mTORC1, parando el crecimiento y la proliferación celular. Esta idea de que el RESV inhibe a mTORC1 es defendida por muchos autores, sin embargo, existe cierta controversia en relación con el mecanismo molecular llevado a cabo. Algunos autores defienden que el resveratrol inhibe la ruta mTORC1 debido a que promueve la asociación entre mTOR y DEPTOR (componente inhibitorio de mTOR) e inhibe como consecuencia a mTORC1 (Liu, 2011). Aunque la hipótesis que parece más clara es que el RESV modula los niveles de AMPc. Como consecuencia, se activan las vías PKA/LKB1y Epac1/CamKII/CamKK β , las cuales confluyen en la activación de la AMPK (Chung, 2012). La activación de la AMPK promueve la activación de TSC2 por fosforilaciones en los residuos de treonina 1227 y serina 1345. Asimismo, RESV activa a la AMPK inhibiendo la vía de mTORC1 por una vía independiente de TSC2, mediante fosforilaciones en la proteína Raptor (Ser 722 y 792), disminuyendo la activación de mTORC1 (Gwinn, 2008).

Una importante conclusión derivada de nuestros experimentos es que TSC2 además de estar unido a SIRT1, puede estar asociado a su vez a diferentes acetil-transferasas, y esto puede estar afectando a la estabilidad de la proteína. La acetil-transferasa atípica (ARD1) presenta actividad acetiltransferasa en posición N-terminal, así como en ϵ -lisinas. Ha sido publicado que ARD1 puede unirse a TSC2 y modificar su estado de acetilación en la posición N-terminal (acetila la primera metionina de TSC2). Esta modificación estabiliza a TSC2, y por consiguiente su activación, inhibiendo la ruta mTORC1 (Kuo, 2010). Esta observación parece que va en contra de nuestros resultados obtenidos, sin embargo, son modificaciones diferentes de TSC2. En el paper de Kuo, ARD1 no afecta al estado de acetilación en lisinas de TSC2. Sin embargo, ARD1 aumenta el estado de acetilación en lisinas de otras proteínas como la β -catenina, y la estabiliza, promoviendo la proliferación en células cancerígenas de pulmón (Lim, 2006). Otros muchos estudios demuestran que el estado de acetilación de diferentes enzimas metabólicas afecta de manera diferente a sus actividades (Zhao, 2010). Por ejemplo, la acetilación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa humana (PEPCK1) se asocia a una disminución en su estabilidad, debido a que promueve su asociación con la ubiquitin ligasa UBR5. De la misma manera que SIRT2 estabiliza a PEPCK1, favoreciendo su actividad gluconeogénica (Jiang, 2011). Otro ejemplo que muestra el efecto de la acetilación de una proteína en la regulación de su actividad, es la de una enzima que está activada en numerosos tipos de cáncer, la ATP citrato liasa. La acetilación de la ATP citrato liasa promueve su estabilización, la cual aumenta la biosíntesis lipídica y el crecimiento del tumor (Lin, 2013). Nuestros resultados indican que la acetilación en lisinas de TSC2 (estimulación con NAM) se correlaciona con un incremento en el estado de ubiquitinación de la proteína, promoviendo su degradación por el sistema ubiquitin-proteasoma, así como con un aumento en la actividad de mTORC1. Asimismo, la sustitución de la lisina 106 de TSC2 por una glutamina (carga negativa y positiva) en el mutante TSC2 K106Q (se considera un mimético de acetilación) resulta en un aumento en la ubiquitinación de la proteína y un incremento en la actividad basal de mTORC1. En este mismo sentido se ha observado que el uso de mutantes de TSC2, en los cuales tienen sustituida una arginina diferente por una glutamina (R611Q y R905Q), presentan un aumento en los niveles de ubiquitinación basal de la proteína y en una disminución de los niveles de la misma (Chong-Kopera, 2006). Por otro lado, un estado menos acetilado de TSC2 (estimulación con RESV) se correlaciona con una disminución en la ubiquitinación, y como consecuencia, un aumento en la estabilidad de la proteína. Otro mutante de TSC2 que tiene la lisina 599 (con alta probabilidad de ser acetilada según programas de predicción de acetilación *in silico*) mutada a metionina (TSC2 K599M), presenta una mayor estabilidad de la proteína debido a que previene su degradación por ubiquitinación. Los cambios observados en ambos mutantes indican que estas lisinas de TSC2 (106 y 599) se modulan por acetilación. Es importante tener en cuenta que la vía de mTORC1 debe estar activada en condiciones de crecimiento, y el RESV (mimético de restricción calórica) bloquea la acetilación de TSC2, favoreciendo su estabilización e inhibiendo la vía de mTORC1.

Usando un mutante de SIRT1 (SIRT1-NLS2-GFP) que se localiza exclusivamente en el citoplasma, hemos observado que se ven potenciados los efectos observados con NAM y RESV en la modulación de la acetilación de TSC2 y de la vía de mTORC1, en comparación con SIRT1-WT. Esta idea apunta a que el estado de acetilación en lisinas de TSC2 está modulado por la acción citosólica de SIRT1. En este contexto, otros trabajos demuestran que células sin núcleo que expresan un mutante de SIRT1 citoplasmático, son capaces de estimular autofagia en respuesta a espermidina o resveratrol (Morselli, 2011). Otra conclusión que puede derivarse de nuestro trabajo es que las células MEF *Sirt1* $-/-$, así como las células MIN6 tratadas con el inhibidor químico de SIRT1 (EX-527), presentan una disminución en los niveles de TSC2, así como un aumento en su estado de acetilación y ubiquitinación de manera basal. En la literatura, hay muchos

trabajos en los que observan un incremento en la acetilación basal de alrededor de 1800 proteínas en las células MEF *Sirt1*^{-/-}, afectando de manera diferente a muchos procesos celulares, tales como la regulación de la cromatina, del metabolismo y de la diferenciación (Chen, 2012).

Es bien conocido que mTORC1 participa en la progresión del ciclo celular. Sin embargo, en diferentes situaciones patogénicas como el cáncer o la diabetes tipo 2, entre otras, existe una desregulación de esta vía (Laplanche, 2013). Trabajos de otros grupos y del nuestro señalan el importante papel del complejo TSC1-TSC2 (proteínas supresoras de tumores), en la regulación de la proliferación celular (Bartolomé, 2010) (Zheng, 2016). La eliminación de TSC2 conduce a un aumento en la activación de mTORC1, y en el crecimiento y la proliferación celular (Mori, 2009). Por lo que moléculas inhibitoras de mTORC1 podrían servir como terapia en estas enfermedades. Nuestros resultados muestran que la NAM activa la proliferación celular. En este sentido, el mutante TSC2 106Q (mimético de acetilación) también activa la proliferación. Por el contrario, el RESV, la rapamicina y el mutante TSC2 K599M disminuyen la proliferación, en comparación con las células sin tratar o el mutante TSC2 WT. El RESV, además, bloquea el ciclo celular en las fases S/G2 y M. Este efecto también es observado en otras células, y esto se ha sugerido que podría ser un indicativo de la activación de mecanismos de reparación de DNA, antes de la entrada en mitosis (Hsieh, 1999) (Ragione, 1998).

Asimismo, TSC2 participa en la activación de la autofagia. En nuestras manos, la autofagia es inhibida en presencia de NAM y activada en respuesta a RESV. La delección de TSC2 en las células MIN6 TSC2shRNA y MEF *Tsc2*^{-/-} conduce a una hiperactivación de mTORC1 crónica, y un impedimento en la modulación de la autofagia por NAM o RESV. En este trabajo se demuestra también que el mutante de TSC2 (K106Q) presenta una menor activación de la autofagia en comparación con el TSC2 K599M y el TSC2 WT. Todos estos datos indican que la modulación de mTORC1 es dependiente de TSC2, lo cual va en el mismo sentido que otro trabajo en el cual observan que las células carentes de TSC2 presentan un impedimento en la activación de la autofagia en respuesta a una privación de aminoácidos (Ng, 2011).

Este estudio, demuestra que el estado de acetilación en lisinas de TSC2 regula la vía mTORC1, la proliferación, y la autofagia, mediada por la actividad de SIRT1. Sin embargo, nuestra hipótesis es que la actividad de TSC2 esté muy probablemente regulada también por otras acetiltransferasas, y que en realidad, sea un balance entre la regulación por acetiltransferasas/desacetilasas de TSC2 la que esté controlando su actividad, la regulación de mTORC1 y la autofagia.

Asimismo, serían necesarios futuros estudios en los que investiguen el papel de TSC2 en la regulación de la autofagia activada por otro tipo de estrés celular. Recientemente, se ha descrito que la hiperactivación de mTORC1 causada por una eliminación de TSC2, conduce a un aumento en el número de mitocondrias mediado por un impedimento en la activación de la autofagia (mitofagia) (Taneike, 2016)(Bartolomé, 2014). Nuestro estudio describe el papel esencial de la vía TSC2/mTORC1 en la eliminación de mitocondrias dañadas en respuesta a un daño oxidativo.

El tratamiento con CCCP (inhibidor de la fosforilación oxidativa) inhibe la vía mTORC1 y activa la autofagia. Algunos autores sugieren que esta inhibición por CCCP es independiente de AMPK (Kwon, 2011). Sin embargo, las células deficientes de TSC2 (MEF *Tsc2*^{-/-}) son incapaces de inhibir la vía mTORC1 y activar la autofagia en respuesta a CCCP. Por otro lado el tratamiento con rapamicina en estas células inhibe eficazmente la vía mTORC1, estimulando la autofagia. Además, esta inhibición de la vía mTORC1, reduce la carga autofágica, que podría contribuir a un fracaso celular por estrés de retículo endoplásmico (RE), como se sugiere en otros trabajos de nuestro grupo en célula β , in vitro (Bartolomé, 2012) e in vivo (Bartolomé, 2014).

Las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentan un mayor número de mitocondrias debido a la activación de la biogénesis mitocondrial mediada por la vía mTORC1. Sin embargo, nuestros experimentos revelaron que las proteínas mitocondriales de las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentaban un mayor envejecimiento debido a un menor reciclaje mitocondrial, así como un aumento en la co-localización de mitocondrias con p62. El CCCP no fue capaz de estimular la autofagia en las células MEF *Tsc2*^{-/-}. De nuevo, la rapamicina mejoró dicha situación, disminuyendo la oxidación y la nitración de las proteínas mitocondriales de las células MIN6 *Tsc2*shRNA. Asimismo, la rapamicina incrementó la co-localización de mitocondrias con p62, así como con LC3 (en respuesta a CCCP) en las células MEF *Tsc2*^{-/-}.

Por otro lado, el análisis del papel de la ruta TSC2/mTORC1 en el mecanismo molecular de regulación de la mitofagia (PINK1/Parkina) reveló que las células MEF *Tsc2*^{-/-} tenían un impedimento en la activación de dicha vía. En nuestras manos, las células carentes de TSC2, así como sus controles (MEF *Tsc2*^{+/+}), disminuyeron su potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en respuesta a CCCP. Sin embargo, las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentaron un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1, así como un impedimento en la translocación de la ubiquitín ligasa Parkina a la mitocondria, en respuesta a CCCP. Asimismo, estas células deficientes de TSC2 presentaron una menor degradación de la proteína de la matriz mitocondrial (HADHA) en respuesta a CCCP. La inhibición de la vía de mTORC1 en estas células carentes de TSC2 mediada por un tratamiento con rapamicina, revirtió el defecto en la capacidad de translocación de Parkina a la mitocondria, activando el proceso de degradación de mitocondrias, y disminuyendo la carga autofágica. También, la rapamicina aumentó la transcripción del ARNm de PINK1, aunque sin efectos sobre la acumulación de la proteína por WB.

Para dilucidar la causa por la que no éramos capaces de observar acumulación de PINK1 en respuesta a rapamicina y CCCP en las células MEF *Tsc2*^{-/-}, nos planteamos que estas células podían tener un aumento en la actividad del proteasoma, para compensar la deficiencia en la respuesta autofágica, y atenuar el estrés de RE. Esta hipótesis se había planteado también en otro trabajo en la literatura (Zhang, 2014). De manera contraria, en otro grupo observan justamente lo contrario, que una inhibición de mTOR, promueve el aumento de la degradación de proteínas por el sistema ubiquitín proteasoma, así como por la autofagia (Zhao, 2015). Sin embargo, nuestros resultados claramente demuestran que PINK1 es regulado negativamente por la hiperactivación de mTORC1, promoviendo una menor estabilización de PINK1 y una mayor degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma. El tratamiento con el inhibidor de la actividad del proteasoma (MG-132) aumenta la estabilidad de la proteína PINK1, y la translocación de Parkina a la mitocondria en respuesta a CCCP. Asimismo, la reintroducción de la proteína TSC2 en las células MEF *Tsc2*^{-/-} es capaz de revertir la acumulación de PINK1 y la activación de la autofagia.

Se ha demostrado en este estudio que la vía TSC2/mTORC1 tiene un importante papel en la modulación de la vía PINK1/Parkina, y la activación de la mitofagia. Sin embargo, serían necesarios futuros estudios para profundizar en la regulación de la dinámica mitocondrial mediada por esta vía, así como en el grado de control que tiene la proteína TSC2 *per se* en la transcripción de ciertos RNAm, como por ejemplo, PINK1.

6 CONCLUSIONES



Esta tesis se ha centrado en el estudio de los mecanismos moleculares que convergen en la vía mTORC1, y los eventos que se encuentran bajo su control para modular la proliferación, la autofagia y la mitofagia, centrándonos en el papel de TSC2. En una primera parte se estudió el efecto de la acetilación en lisinas de TSC2 sobre la estabilidad de la proteína, modulación de la actividad de mTORC1, proliferación y autofagia, en diferentes líneas celulares. En la segunda parte, se hace hincapié en el análisis de la importancia de la vía TSC2/mTORC1 sobre la regulación de la homeostasia mitocondrial.

Las conclusiones derivadas de esta tesis son las siguientes:

1. La NAM aumenta y el RESV previene de la acetilación en lisinas de TSC2. La acetilación de TSC2 está relacionada con una disminución en la estabilidad de la proteína, favoreciendo la actividad de mTORC1, la proliferación y la inhibición de la autofagia. De manera contraria, un estado menos acetilado de TSC2 previene de la degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma, inhibiendo la vía mTORC1 y la proliferación, y activando la autofagia.
2. SIRT1 interacciona por la región N-terminal de TSC2, modulando su estado de acetilación.
3. Los efectos observados por NAM o RESV sobre la modulación de la vía mTORC1 y autofagia son dependientes de TSC2.
4. La hiperacetilación de TSC2, causada por una delección de SIRT1 o una inhibición química de la actividad desacetilasa, conduce a una disminución en la estabilidad de la proteína mediada por un aumento en la ubiquitinación de la misma, y a una hiperactivación de mTORC1.
5. Los mutantes TSC2 K106Q y TSC2 K599M, presentes en pacientes con esclerosis tuberosa (TSC), presentan una disminución en el estado de acetilación en lisinas con respecto a TSC2 WT, lo que sugiere que estas lisinas (106 y 599) de TSC2 son susceptibles de ser moduladas por acetilación.
6. El mutante de TSC2 mimético de acetilación (TSC2 K106Q) presenta un aumento en el estado de ubiquitinación, ligado a una disminución en la estabilidad de la proteína, en comparación con el mutante TSC2 K599M, así como con el TSC2 WT.
7. El mutante de TSC2 K106Q presenta una alteración en el flujo autofágico en respuesta a RESV.
8. La NAM y el TSC2 K106Q activan la vía de mTORC1, aumentando la proliferación celular en las células β pancreáticas MIN6 y en las HEK 293T. De manera contraria, el RESV y el TSC2 K599M inhiben la vía mTORC1, disminuyendo la proliferación celular. Asimismo, el RESV produce una parada en el ciclo celular.
9. La hiperactivación de la ruta mTORC1 causada por la eliminación de TSC2, resulta en un impedimento en la respuesta autofágica y mitofágica mediada por un daño oxidativo.
10. Las células carentes de TSC2 presentan un mayor número de mitocondrias, pero presentan un mayor envejecimiento de las mitocondrias debido principalmente a un defecto en la mitofagia. La rapamicina en estas células deficientes de TSC2, activa la mitofagia, y disminuye la carga autofágica.

11. Las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentan un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1 en respuesta a CCCP, y en la translocación de Parkina a la mitocondria.
12. La sobreexpresión de Parkina en las células MEF *Tsc2*^{-/-} activa la autofagia de manera independiente a la acumulación de PINK1.
13. La reintroducción de la proteína TSC2 en las células carentes de TSC2, produce un aumento en la expresión de la proteína PINK1, y activa la autofagia.
14. La acumulación de la proteína PINK1 en la membrana mitocondrial tras un daño mitocondrial, y por lo tanto, la activación de la respuesta mitofágica, es dependiente de la inhibición del proteasoma en las células deficientes de TSC2, las cuales presentan hiperactivación de la vía mTORC1.

Conclusión final:

La hiperactivación crónica de la vía mTORC1 está implicada en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, diabetes tipo 2 y cáncer. Por ello, es esencial profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes que regulan la actividad de esta vía, para el desarrollo de futuras dianas terapéuticas dirigidas a la estimulación de los mecanismos de defensa ante situaciones de estrés celular. En este contexto, se ha demostrado que la proteína TSC2 juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasia celular: regulación de la vía mTORC1 y proliferación, y activación de la autofagia y mitofagia.

7 BIBLIOGRAFÍA



- Avalos, J. (2005). Mechanism of Sirtuin Inhibition by Nicotinamide: Altering the NAD⁺ Cosubstrate Specificity of a Sir2 Enzyme. *Molecular Cell.*, 17, 855-868.
- Adachi, Y. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. 33(75-89).
- Bartolomé, A. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology*, 151, 3084-94.
- Bartolome, A. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy*, 8, 1757-68.
- Bartolomé, A. (2014). Pancreatic β -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*, 63, 2996-3008.
- Bartolomé, A. (In process). Key role of MTORC1 for macroautophagy and mitophagy induction after oxidative phosphorylation uncoupling. *Autophagy*, In process.
- Bitterman, K. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem.*, 277, 45099-107.
- Blander, G. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 417-35.
- Blommaert, E. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 270, 2320-6.
- Bordone, L. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *Plos Biol*, 4, e31.
- Brooks, C. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer.* , 9, 123-128.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. 414(813-820).
- Brunet, A. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2011-5.
- Brüning, J. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. . 2(559-569).
- Cantó, C. (2011). Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology*, 26, 214-224.
- Cabrera, O. (2005). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. 103(2334-2339).
- Chen, H. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.*, 160, 189-200.
- Chen, Y. (2012). Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol. Cell. Proteomics*, 11, 1048-1062.
- Chick, W., & Like, A. (1970). Studies in the diabetic mutant mouse: III. Physiological factors associated with alterations in beta cell proliferation. 6(243-351).
- Chong-Kopera, H. (2006). TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* , 281, 8313-6.
- Chung, J. (2012). Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol.*, 22, 546-554.
- Cuervo, A. (2011). Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 535-541.
- Demetriades, C. (2014). Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell*, 156, 786-799.

- DeYoung, M. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes Dev.*, 22, 239–251.
- Dolinsky, V. (2011). Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim Biophys Acta.*, 1812, 1477–89.
- Ebato, C. (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.*, 8, 325–32.
- Edvell, A., & P. L. (1997). Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå ob/ob). . 44(906–913).
- El-Assaad, W. (2003). Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. 144(4154–4163).
- Fernandez, M. (2014). Human IAPP amyloidogenic properties and pancreatic β -cell death. 56(416–27).
- Gan, B. (2005). Identification of FIP200 interaction with the TSC1–TSC2 complex and its role in regulation of cell size control. *J Cell Biol.*, 170, 379–389.
- Gao, J. (2010). Musite: a tool for global prediction of general and kinase-specific phosphorylation sites. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9, 2586–2600.
- García-Aguilar, A. (2016). TSC2 N-terminal lysine acetylation status affects to its stability modulating mTORC1 signaling and autophagy. *BBA Molecular Cell Research*, Accepted
- Ghavami, S. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24–49.
- Ghosh, H. S. (2010). SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *Plos One*, 5, e9199.
- Gonzalez, D. (2011). The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*, 2–11.
- González-Rodríguez, Á. (2015). Resveratrol treatment restores peripheral insulin sensitivity in diabetic mice in a sirt1-independent manner. *Mol Nutr Food Res.*, 59, 1431–42.
- Gwinn, D. (2008). AMPK phosphorylation of Raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell*, 30, 214–226.
- Harding, H. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. 5(897–904).
- Harding, H. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk $^{-/-}$ mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. 7(1153–63).
- Harding, H. (2001b). Translational regulation in the cellular response to biosynthetic load on the endoplasmic reticulum. 66(499–508).
- Hassler, J. (2015). The IRE1 α /XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells. 13(e1002277).
- Hernández, G. (2013). Mitotimer: a novel tool for monitoring mitochondrial turnover. *Autophagy*, 9, 1852–1861.
- Holst, J., & Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. . 287(E199–E206).
- Höppener, J. (2000). Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. 343(411–419).
- Hsieh, T. (1999). Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.*, 59, 2596–2601.
- Huang, J. Manning, B.D. (2008). The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 412, 179–90.
- Hu, M. (2016). Resveratrol via activation of LKB1-AMPK signaling suppresses oxidative stress to prevent endothelial dysfunction in diabetic mice. *Clinical and Experimental Hypertension*, 38, 381–387.

- Inoki, K. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-34.
- Jaikaran, E. (2001). Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. 1537, 179-203.
- Jang, S. (2012). Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. . 287, 19304-14.
- Jean, S. (2014). Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science*, 127, 923–928.
- Jiang, W. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol. Cell.*, 43, 33-44.
- Jin, S. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*, 191, 933-42.
- Jung, H.S. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab*, 8, 318-24
- Kim, J. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. 13(132-41).
- Klionsky, D. (2007). How shall I eat thee? Autophagy, 3, 413-416.
- Kuo, H. (2010). ARD1 stabilization of TSC2 suppresses tumorigenesis through the mTOR signaling patstabilization of TSC2 suppresses tumorigenesis through the mTOR signaling pathway. *Sci Signal.*, 3, ra9.
- Kwon, K. (2011). CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* , 416, 343-8.
- Laplante, M. (2013). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-293.
- Lee, A. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. 23(7448-59).
- Lee, I. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105, 3374-9.
- Lee, Y. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15, 5001-11.
- L'Hernault, S. (1985). Chlamydomonas α -tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the ϵ -amino group of a lysine. *Biochemistry*, 24, 473–478.
- Li, A. (2006). Prediction of acetylation on internal residues. *Biochem Biophys Res Commun.*, 350, 818-824.
- Li, S. (2009). Improved prediction of lysine acetylation by support vector machines. *Protein Pept Lett.*, 16, 977-083.
- Li, T. (2012). Characterization and prediction of lysine (K)-acetyl-transferase specific acetylation sites. . *Mol Cell Proteomics.*, 11, 1-9.
- Lim, J. (2006). Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation. *Cancer Res.*, 66, 10677-10682.
- Lin, R. (2013). Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. *Mol. Cell*, 51, 506-518.
- Lin, S.Y. (2012). GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*, 336, 477-81.
- Lingohr, M.K. (2006). Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem*, 281, 15884-15892.
- Lipson, K. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. 4(245-54).

- Liu, M. (2011). Resveratrol inhibits mTOR signaling by targeting DEPTOR. *Commun Integr Biol.* 4, 382-384.
- Lizcano, J. (2002). The insulin signalling pathway. *12*(236-238).
- Malka, F. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.*, 6, 853-9.
- Masoro, E. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*, 126, 913-22.
- Matyus, P. (2010). Welcome to new insights into 'Metabolic Syndrome'. *Future Med Chem*, 2, 1719-20.
- McCay, C. (1935). The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutr.*, 10, 63-79.
- Merksamer, P. (2010). The UPR and cell fate at a glance. *123*(1003-1006).
- Michael, M. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *6*(87-97).
- Montanya, E. (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*, 49, 1341-46.
- Mori, H. (2009). Critical role for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 297, 1013-1022.
- Morselli, E. (2011). Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetyproteome. *J. Cell. Biol.*, 192, 615-629.
- Motta, M. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.*, 116, 551-63.
- Murrow, L. (2013). Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol.*, 8, 105-37.
- Newsholme, P. (2007). Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *35*(1180-1186).
- Nijman, S.M. (2005). A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell*, 123, 773-786.
- Ng, S. (2011). Impaired autophagy due to constitutive mTOR activation sensitizes TSC2-null cells to cell death under stress. *Autophagy*, 7, 1173-86.
- Noda, T. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273, 3963-3966.
- Okatsu, K. (2012). PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Communications*, 3, 10.1038.
- Olichon, A. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.*, 523, 171-6.
- Omodei, D. (2011). Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.*, 585, 1537-42.
- Osowski, C. (2011). The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed beta cells. *Curr Opin Cell Biol*, 207-215.
- Oyadomari, S. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *109*(525-532).
- Ozcan, U. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *306*(457-61).
- Pattingre, S. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122, 927-39.
- Prentki, M. (2006). Islet β cell failure in type 2 diabetes. *116*(1802-1812).

- Quan, W. (2012). Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia*, 55, 392-403.
- Ragione, F. (1998). Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 53-58.
- Rao, R. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. 276(33869-74).
- Ravid, T. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Mol Cell Biol.*, 9, 679-90.
- Ravikumar, B. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 585–595, 36, 585–595.
- Ron, D. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. 8(519–529).
- Sancak, Y. (2010). Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell*, 141, 290-303.
- Sanger, N. (2000). Cell cycle-related expression and ligand binding of peripheral benzodiazepine receptor in human breast cancer cell lines. *Eur J Cancer.*, 36, 2157-2163.
- Scaglia, L. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. . 136(5461-5468).
- Scaglia, L. (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. . 138(1736-1741).
- Scheuner, D. (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. 11(757-64).
- Seino, S. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. 121(2118–2125).
- Shang, F. (2012). Roles for the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Protein Quality Control and Signaling in the Retina: Implications in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Mol Aspects Med*, 33, 446–466.
- Shpilka, T. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology*, 12, 226.
- Singh, R. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.*, 13, 495-504.
- Sorenson, R. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. . 29(301–307).
- Steil, G. (2001). Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. 280(E788–E796).
- Stumboll, M. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. 365(1333–1346).
- Taneike, M. (2016). mTOR Hyperactivation by Ablation of Tuberous Sclerosis Complex 2 in the Mouse Heart Induces Cardiac Dysfunction with the Increased Number of Small Mitochondria Mediated through the Down-Regulation of Autophagy. *Plos One*, 11. e0152628
- Tanno, M. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.*, 282, 6823-6832.
- Tsukada, M. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333, 169-74.
- Twig, G. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 27, 433-46.
- Urano, F. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. 287(664–6).

- Van Citters, G. (2002). Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *Diabetes*, 51, 5191–5198.
- Varela, I. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*, 437, 564–568.
- Wang, J. (1999). A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic β -cell dysfunction in the Mody mouse. *Diabetes*, 48, 27–37.
- Wang, L. (2012). ASEB: A web server for KAT-specific acetylation prediction. *Nucleic Acids Res.*, 40, W376–W379.
- Westermarck, P. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Diabetes*, 60, 795–826.
- Wild, P. (2014). The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science*, 127, 3–9.
- Yamamoto, H. (2007). Sirtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology*, 21, 1745–1755.
- Yen, W. (2004). How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)*, 23, 248–62.
- Yoon, Y. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol.*, 23, 5409–20.
- Yu, T. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103, 2653–8.
- Zang, M. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55, 2180–2191.
- Zhang, C. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Diabetes*, 50, 745–755.
- Zhang, Y. (2014). Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature*, 513, 440–3.
- Zhao, J. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 15790–7.
- Zhao, S. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein acetylation. *Science*, 327, 1004–07.
- Zhao, Z. (2010b). Protection of pancreatic beta-cells by group VIA phospholipase A(2)-mediated repair of mitochondrial membrane peroxidation. *Diabetes*, 59, 3038–3048.
- Zheng, X. (2016). Focal Adhesion Kinase Directly Interacts with TSC2 Through its FAT Domain and Regulates Cell Proliferation in Cashmere Goat Fetal Fibroblasts. *DNA Cell Biol*, Epub ahead of print.
- Zoncu, R. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Molecular Cell Biology*, 31, 21–35.

8 ANEXOS



8.1. Anexo 1

Variantes patogénicas y no patogénicas de TSC1 y TSC2.

Gene	Protein Variant	LOVD classification ^b	Functional assessment ^c	Exome Variant Server ^d
TSC1	L41I	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	L50P	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	E51D	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	L61R	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	L61P	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	H68R	Probably pathogenic	-	-
TSC1	L72P	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	I76N	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	K82T	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	A84T	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0231)
TSC1	L93R	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC1	L116V	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC1	L117P	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	K121R	Unknown	Probably neutral (predicted splice mutation)	-
TSC1	V126I	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	G132D	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	V133I	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	V133F	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	F158C	Probably pathogenic	-	-
TSC1	F158S	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	V178I	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	L180P	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	R190C	No known pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	R190P	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	L191R	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	L191H	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	V200I	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	R204P	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC1	F216S	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC1	M224R	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC1	R246K	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mutation)	-
TSC1	R246T	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mutation)	-

TSC1	F285V	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0077)
TSC1	G305R	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mutation)	-
TSC1	G305W	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mutation)	-
TSC1	M322T	No known pathogenicity	-	Reported (16.5462)
TSC1	S334L	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0308)
TSC1	R336W	Unknown	-	Reported (0.0231)
TSC1	R336Q	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	T360N	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0461)
TSC1	P362S	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	S403L	No known pathogenicity	-	Reported (0.0615)
TSC1	L411I	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	T417I	No known pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	P448S	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.3844)
TSC1	G452R	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	E478G	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	S487C	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC1	R500Q	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	R509Q	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0846)
TSC1	A523P	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	Q550E	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	A567V	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	S575F	No known pathogenicity	-	-
TSC1	E577D	No known pathogenicity	-	-
TSC1	K587R	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0923)
TSC1	H617D	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	Q654E	No known pathogenicity	-	-
TSC1	D658E	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	A659V	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC1	G680E	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	D693H	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	L698R	Unknown	-	-
TSC1	Q701H	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	A726E	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	H732Y	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.2691)

TSC1	N762S	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0384)
TSC1	I807T	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	E809Q	No known pathogenicity	-	Reported (0.0154)
TSC1	R811G	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	S829R	No known pathogenicity	-	-
TSC1	S829C	Unknown	-	-
TSC1	A883T	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0231)
TSC1	R885W	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0308)
TSC1	T899S	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	L978V	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	E1010D	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	G1035S	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.1232)
TSC1	R1062W	Unknown	Probably neutral	-
TSC1	R1097H	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC1	G1108S	Probably no pathogenicity	-	-
TSC1	D1146Y	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	T5A	No known pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	K7R	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	E47D	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	R57H	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC2	G62E	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	A84V	No known pathogenicity	-	Reported (0.0154)
TSC2	P91L	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0694)
TSC2	E92V	Unknown	-	Reported (0.1466)
TSC2	P94T	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R98W	Probably no pathogenicity	Destabilising, pathogenic	Reported (0.0077)
TSC2	E114K	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	S132C	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	H137R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	F143L	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	L146R	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L160V	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	A161V	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L180V	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	N187I	Probably pathogenic	-	-
TSC2	A196T	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	M198T	Probably pathogenic	-	-

TSC2	M201I	No known pathogenicity	-	-
TSC2	E216K	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	L219P	Unknown	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	L222P	Unknown	-	-
TSC2	D223Y	Unknown	-	-
TSC2	C227Y	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S235N	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	C244Y	Probably pathogenic	-	-
TSC2	C244R	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	R245H	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	T246A	Unknown	-	Reported (0.0077)
TSC2	E254K	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC2	R261P	Probably pathogenic	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	R261W	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0082)
TSC2	L264P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	N275K	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	M286T	No known pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	M286V	No known pathogenicity	-	Reported (0.0463)
TSC2	G294R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	V299G	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	W304R	Unknown	-	-
TSC2	L309Q	No known pathogenicity	-	-
TSC2	L320F	Unknown	-	-
TSC2	A328P	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	N331K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	V334A	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	V334G	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	S335C	No known pathogenicity	-	-
TSC2	E337K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L340P	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L345R	Unknown	-	-
TSC2	A357V	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0308)
TSC2	L362P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	R367Q	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (1.5005)
TSC2	Q373P	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mut.)	-
TSC2	P378L	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	R381K	Probably no pathogenicity	-	-

TSC2	L387P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L410R	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	E412V	Probably pathogenic	Probably neutral (splice mut.)	-
TSC2	D416Y	Probably pathogenic	-	-
TSC2	P419S	Probably pathogenic	Probably neutral (predicted splice mut.)	-
TSC2	I427M	Unknown	Possibly pathogenic	-
TSC2	S433C	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	G440S	No known pathogenicity	-	Reported (0.1154)
TSC2	A447V	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0077)
TSC2	L448P	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	M449I	Unknown	-	-
TSC2	E456K	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	A460T	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0799)
TSC2	R462C	Probably pathogenic	Probably pathogenic	-
TSC2	R462H	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	R462P	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	I463V	No known pathogenicity	-	Reported (0.1133)
TSC2	L466R	Unknown	-	-
TSC2	L466P	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	N486I	Probably pathogenic	-	-
TSC2	I490V	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	L493P	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L493V	Unknown	Possibly pathogenic	-
TSC2	E498K	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	R505Q	Unknown	possibly pathogenic	Reported (0.0077)
TSC2	H522P	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	H522Y	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	N525S	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC2	K533N	Probably pathogenic	-	-
TSC2	A536V	No known pathogenicity	-	-
TSC2	P543L	No known pathogenicity	-	-
TSC2	E544D	Unknown	-	-
TSC2	V560M	Unknown	Pathogenic	Reported (0.0077)
TSC2	P579A	No known pathogenicity	-	-
TSC2	S581N	No known pathogenicity	-	-

TSC2	A583T	No known pathogenicity	-	Reported (0.2693)
TSC2	R585H	Unknown	-	-
TSC2	L590P	No known pathogenicity	-	-
TSC2	H593R	No known pathogenicity	-	-
TSC2	L596P	Unknown	-	-
TSC2	H597R	Unknown	-	-
TSC2	H597Y	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	Y598H	Probably pathogenic	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	Y598C	Unknown	Probably pathogenic	-
TSC2	K599M	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	A607S	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	A607T	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0616)
TSC2	A607E	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	R611G	Probably pathogenic	-	-
TSC2	R611W	Pathogenic	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	R611Q	Pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	A614D	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	F615S	Unknown	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	R622P	Unknown	-	-
TSC2	R622Q	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0154)
TSC2	R622W	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	R628G	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	S641I	Unknown	-	-
TSC2	D647N	No known pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	M649T	Unknown	Probably neutral	Reported (0.1385)
TSC2	G654C	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	K658T	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	G661R	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	G661V	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	P670L	Probably no pathogenicity	Pathogenic	-
TSC2	L693P	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	C696R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	C696Y	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	E700K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	V705E	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	V705M	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L717R	Probably pathogenic	-	-

TSC2	R718P	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	L733P	Unknown	-	-
TSC2	L737P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S758F	Unknown	-	-
TSC2	V769E	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	A772E	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	M788R	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	L792P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L792R	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	C804R	Unknown	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	L808S	Probably pathogenic	-	-
TSC2	E814K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	P816L	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L826P	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	L826M	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0846)
TSC2	L830R	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L844P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L844R	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	F846Y	No known pathogenicity	-	-
TSC2	L847P	Pathogenic	-	-
TSC2	L850P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	A862V	No known pathogenicity	-	-
TSC2	F881L	Unknown	-	-
TSC2	A889P	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	A889V	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	M895V	Probably pathogenic	-	-
TSC2	F897S	Pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	R905Q	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	R905G	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	R905W	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	K914N	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L916R	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC2	S918C	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	S932N	Unknown	-	-
TSC2	F933C	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R951S	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	N958S	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	V963M	Unknown	-	-
TSC2	R988P	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	T993M	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0077)
TSC2	A1009S	No known pathogenicity	-	-

TSC2	D1013N	Unknown	-	-
TSC2	L1027P	Pathogenic	-	-
TSC2	D1028G	Unknown	-	-
TSC2	D1028N	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC2	R1032P	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	Y1033H	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	S1036P	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	V1047A	Unknown	-	Reported (0.0385)
TSC2	W1060R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L1061P	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC2	L1066P	Unknown	-	-
TSC2	T1068I	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	T1071R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	T1075I	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	T1077I	Unknown	-	-
TSC2	D1084E	No known pathogenicity	-	-
TSC2	E1087D	No known pathogenicity	-	-
TSC2	S1095N	Probably pathogenic	-	-
TSC2	V1120E	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	R1122C	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	D1126V	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	A1141T	Unknown	-	Reported (0.0077)
TSC2	A1141V	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.6389)
TSC2	V1144L	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	V1144M	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC2	P1145L	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	G1151S	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1159W	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	R1159Q	Probably no pathogenicity	Unstable, probably neutral	-
TSC2	R1159L	Unknown	Unstable, probably neutral	Reported (0.0154)
TSC2	A1164V	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0308)
TSC2	Y1186C	No known pathogenicity	-	Reported (0.0231)
TSC2	V1199G	Unknown	Unstable, pathogenic	-
TSC2	R1200W	Pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC2	P1202H	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	T1203K	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	G1204R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1204E	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	S1207I	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	W1208R	Unknown	-	-

TSC2	W1208G	No known pathogenicity	-	-
TSC2	L1235F	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1240C	No known pathogenicity	-	-
TSC2	A1257V	No known pathogenicity	-	Reported (0.0231)
TSC2	A1261D	Probably pathogenic	-	-
TSC2	P1265S	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1268H	Unknown	-	-
TSC2	S1276F	No known pathogenicity	-	-
TSC2	S1282G	No known pathogenicity	-	-
TSC2	A1297T	No known pathogenicity	-	Reported (0.3249)
TSC2	P1305S	Unknown	-	-
TSC2	P1305L	No known pathogenicity	-	Reported (0.7186)
TSC2	P1315A	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	P1315S	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	D1319V	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	R1329H	Probably no pathogenicity	-	Reported (1.651)
TSC2	T1330M	Unknown	-	-
TSC2	S1341R	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	P1358L	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	R1369W	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0231)
TSC2	S1379L	Unknown	Unlikely to be pathogenic	-
TSC2	P1381L	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	G1399R	No known pathogenicity	-	Reported (0.1003)
TSC2	V1407L	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1409W	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0077)
TSC2	S1427T	Unknown	-	-
TSC2	A1429S	No known pathogenicity	-	Reported (0.2324)
TSC2	S1433L	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	R1438Q	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1439D	Unknown	Probably neutral	Reported (0.4412)
TSC2	E1442K	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	P1450R	No known pathogenicity	-	-
TSC2	S1452L	No known pathogenicity	-	-
TSC2	S1454G	Probably no pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	D1478H	No known pathogenicity	-	-
TSC2	A1479V	Unknown	-	-
TSC2	P1497R	Pathogenic	Pathogenic	-

TSC2	P1497S	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	P1497T	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	S1498N	Pathogenic	-	-
TSC2	V1500G	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	V1500M	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	Q1503H	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Q1503P	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	L1504H	Probably pathogenic	-	-
TSC2	N1522S	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0154)
TSC2	F1527L	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0154)
TSC2	L1534H	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC2	D1535Y	Probably pathogenic	-	-
TSC2	D1535V	Probably pathogenic	-	-
TSC2	D1535A	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	Y1549N	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Y1549C	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Q1554P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Q1554H	Unknown	Probably pathogenic	-
TSC2	E1558K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L1562P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1567V	Unknown	Destabilising, pathogenic	-
TSC2	G1567D	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	R1570W	Pathogenic	-	-
TSC2	Y1571C	Pathogenic	-	-
TSC2	Y1571N	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	T1576M	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	L1578P	Probably pathogenic	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	G1579S	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	L1584R	Unknown	Probably pathogenic	-
TSC2	L1594M	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1595R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1596V	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L1597P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	W1610G	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	F1619S	Probably pathogenic	-	-
TSC2	H1620Y	Pathogenic	-	-
TSC2	H1620R	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	T1623I	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L1624P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	D1636N	No known pathogenicity	-	-
TSC2	K1638N	Unknown	-	-
TSC2	R1639L	Unknown	-	-
TSC2	H1640Y	Unknown	Pathogenic	-

TSC2	G1642D	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	N1643H	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	N1643I	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	N1643S	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	N1643K	Probably pathogenic	Unstable, pathogenic	-
TSC2	D1644H	No known pathogenicity	-	-
TSC2	V1646G	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	I1648T	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Y1650N	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Y1650C	Probably pathogenic	-	-
TSC2	N1651S	Pathogenic	-	-
TSC2	S1653F	Probably pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	S1653P	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	L1659F	No known pathogenicity	-	-
TSC2	V1673I	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	V1673L	No known pathogenicity	-	-
TSC2	V1673D	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	V1673F	Unknown	Pathogenic	-
TSC2	T1674P	Unknown	-	-
TSC2	P1675L	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	E1679K	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0385)
TSC2	N1681K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S1684P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Q1686P	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	K1689E	No known pathogenicity	-	-
TSC2	D1690H	Probably pathogenic	-	-
TSC2	D1690Y	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S1698R	No known pathogenicity	-	Reported (0.1154)
TSC2	V1703G	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S1704T	Unknown	-	-
TSC2	R1706H	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1706C	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0231)
TSC2	P1709R	Probably pathogenic	-	-
TSC2	P1709L	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	V1711M	Probably no pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.0462)
TSC2	A1712D	Unknown	-	-
TSC2	R1713P	Unknown	-	-
TSC2	R1713H	Unknown	Unstable, destabilising, pathogenic	-
TSC2	M1715V	Unknown	-	-
TSC2	A1716P	Probably pathogenic	-	-

TSC2	L1717P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	N1720K	Probably pathogenic	-	-
TSC2	M1721L	Probably pathogenic	-	-
TSC2	S1723P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	R1729C	No known pathogenicity	-	Reported (0.0385)
TSC2	D1734E	No known pathogenicity	Probably neutral	-
TSC2	R1743G	Probably pathogenic	-	-
TSC2	R1743L	Unknown	-	-
TSC2	R1743P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	R1743Q	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	R1743W	Pathogenic	Pathogenic	-
TSC2	L1744P	Probably pathogenic	-	-
TSC2	L1750F	Unknown	-	-
TSC2	A1759D	probably no pathogenicity	-	-
TSC2	P1771L	Unknown	Probably neutral	Reported (0.0308)
TSC2	H1773P	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	S1774T	Unknown	Probably neutral	Reported (1.0005)
TSC2	G1787S	No known pathogenicity	-	Reported (0.1617)
TSC2	E1789Q	Probably pathogenic	-	-
TSC2	G1791S	Probably pathogenic	-	-
TSC2	Q1792H	Probably no pathogenicity	-	-
TSC2	R1793Q	Probably no pathogenicity	-	Reported (0.0077)
TSC2	R1795L	No known pathogenicity	-	-
TSC2	R1795C	No known pathogenicity	Probably neutral	Reported (0.1309)
TSC2	L1796I	Unknown	Probably neutral	-
TSC2	V1807L	Probably no pathogenicity	-	-

aAmino acid position based on Swiss-Prot accession # Q92574.2 and P49815.2 for TSC1 and TSC2, respectively.

b Pathogenicity of the variant as concluded by Leiden Open Variation Database.

c Pathogenicity of the variant as concluded by published functional studies.

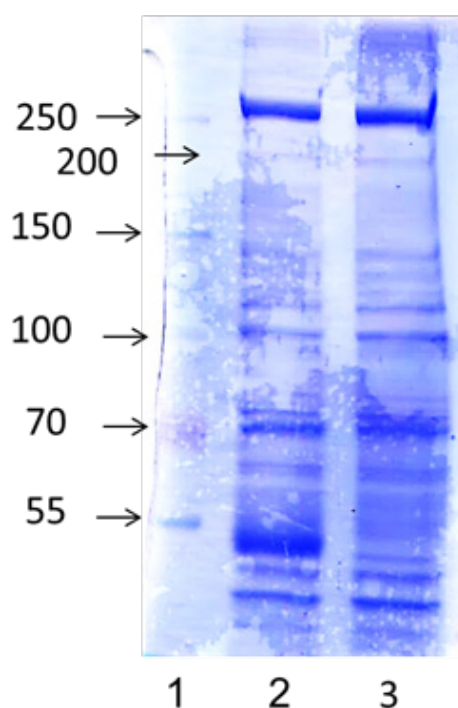
d Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. The values in parantheses denote minor allele frequency in percent.

8.2 Anexo 2.

Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie.

(1) Patrón de peso molecular en kDa.

Muestra control (2) y nicotinamida (3) procedente de la inmunoprecipitación de TSC2 de las células HEK 293 T.



8.3 Anexo 3.

Purificación de V5 (TSC2) con columnas de cromatografía de afinidad

Anexo 8.3.1. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células control

Description	Score
10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2 - [CH10_HUMAN]	4,84
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EFTUD2 PE=1 SV=1 - [K7EP67_HUMAN]	2,27
14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4 - [1433F_HUMAN]	8,32
14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 - [1433G_HUMAN]	11,22
14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 - [1433T_HUMAN]	20,69
14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]	19,96
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSMD2 PE=1 SV=3 - [PSMD2_HUMAN]	12,64
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3 - [HCD2_HUMAN]	7,01
40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1 - [RS10_HUMAN]	11,43
40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3 - [RS12_HUMAN]	4,92
40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2 - [RS13_HUMAN]	7,04
40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3 - [RS14_HUMAN]	8,51
40S ribosomal protein S15a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=1 - [H3BVC7_HUMAN]	4,70
40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=1 - [M0R210_HUMAN]	14,20
40S ribosomal protein S17 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS17 PE=1 SV=1 - [H0YN73_HUMAN]	7,55
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3 - [RS18_HUMAN]	13,22
40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2 - [RS19_HUMAN]	17,37
40S ribosomal protein S2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=1 - [H0YEN5_HUMAN]	11,45
40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1 - [RS20_HUMAN]	6,98
40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens GN=RPS23 PE=1 SV=3 - [RS23_HUMAN]	8,05
40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1 - [RS25_HUMAN]	15,00

40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=1 SV=3 - [RS26_HUMAN]	5,31
40S ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=RPS27 PE=1 SV=3 - [RS27_HUMAN]	1,75
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]	38,10
40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=4 - [D6RB09_HUMAN]	11,29
40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 - [RS4X_HUMAN]	21,36
40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1 - [M0R0F0_HUMAN]	20,55
40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 - [RS7_HUMAN]	5,18
40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2 - [RS8_HUMAN]	27,00
40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3 - [RS9_HUMAN]	13,60
40S ribosomal protein SA (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4 - [C9J9K3_HUMAN]	19,93
4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=1 - [F5GZIO_HUMAN]	5,05
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]	51,74
60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 - [F8V-QY6_HUMAN]	10,42
60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1 - [RLA2_HUMAN]	7,49
60S ribosomal protein L11 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=1 - [Q5VVC9_HUMAN]	6,91
60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1 - [RL12_HUMAN]	10,82
60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=1 SV=1 - [E7EPB3_HUMAN]	6,79
60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens GN=RPL18A PE=1 SV=1 - [M0R0P7_HUMAN]	5,42
60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1 - [RL23_HUMAN]	8,69
60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1 - [K7EMA7_HUMAN]	4,61
60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1 - [C9JXB8_HUMAN]	4,75
60S ribosomal protein L26 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL26 PE=4 SV=4 - [J3KTJ8_HUMAN]	4,12
60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2 - [RL27_HUMAN]	6,77
60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=1 - [E9PJD9_HUMAN]	5,09
60S ribosomal protein L30 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=1 - [E5RI99_HUMAN]	7,14
60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=1 - [F2Z388_HUMAN]	5,35
60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5 - [RL4_HUMAN]	27,42
60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 - [RL6_HUMAN]	15,23

60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1 - [A8MUD9_HUMAN]	15,42
60S ribosomal protein L7a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=1 - [Q5T8U3_HUMAN]	15,33
60S ribosomal protein L8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=1 - [E9PKZ0_HUMAN]	4,98
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	63,96
Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACO2 PE=1 SV=2 - [ACON_HUMAN]	5,38
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 - [ACTC_HUMAN]	87,09
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	161,71
Actin-related protein 10 OS=Homo sapiens GN=ACTR10 PE=1 SV=1 - [ARP10_HUMAN]	8,40
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_HUMAN]	6,76
Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTR3 PE=1 SV=3 - [ARP3_HUMAN]	2,94
Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4 - [SAHH_HUMAN]	18,16
ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	9,24
ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4 - [ADT3_HUMAN]	9,08
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=AARS PE=1 SV=2 - [SYAC_HUMAN]	5,03
Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1 - [A1AG1_HUMAN]	4,66
Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2 - [AACT_HUMAN]	3,91
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 - [FETUA_HUMAN]	10,45
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 - [ACTN4_HUMAN]	33,46
Alpha-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1A PE=1 SV=1 - [ACTZ_HUMAN]	35,73
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]	66,06
Angiomotin OS=Homo sapiens GN=AMOT PE=1 SV=1 - [AMOT_HUMAN]	15,65
Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA6 PE=1 SV=1 - [E5RK69_HUMAN]	2,55
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 - [APOA1_HUMAN]	22,88
Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=1 SV=3 - [AATM_HUMAN]	22,07
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5F1 PE=1 SV=1 - [Q5QNZ2_HUMAN]	5,18
ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=1 - [H0YH81_HUMAN]	13,22
Beta-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1B PE=1 SV=1 - [ACTY_HUMAN]	20,13
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=EPRS PE=1 SV=5 - [SYEP_HUMAN]	5,75
Bystin OS=Homo sapiens GN=BYSL PE=1 SV=3 - [BYST_HUMAN]	4,54

C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3 - [C1TC_HUMAN]	27,00
Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2 - [CALX_HUMAN]	15,17
Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1 - [CALR_HUMAN]	12,12
Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=1 SV=1 - [B1AK87_HUMAN]	19,11
Caprin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CAPRIN1 PE=1 SV=1 - [E9PLA9_HUMAN]	8,25
Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=1 SV=3 - [CBR1_HUMAN]	10,95
Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC42 PE=1 SV=2 - [CDC42_HUMAN]	8,07
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CDC2 PE=1 SV=1 - [A0A024QZP7_HUMAN]	8,27
Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 - [CLIC1_HUMAN]	9,34
Chromosome 6 open reading frame 55, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=VTA1 PE=1 SV=1 - [A0A087WY55_HUMAN]	11,04
Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=1 - [G3V1A4_HUMAN]	8,02
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]	52,58
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1 - [C1QBP_HUMAN]	4,94
Copine-3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=1 - [CPNE3_HUMAN]	5,36
Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1 - [KCRB_HUMAN]	28,25
CTP synthase 1 OS=Homo sapiens GN=CTPS1 PE=1 SV=2 - [PYRG1_HUMAN]	5,42
Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]	4,74
Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=1 SV=2 - [CKAP4_HUMAN]	3,44
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]	28,53
D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDT PE=1 SV=3 - [DOPD_HUMAN]	5,38
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	8,68
Desmoglein-2 OS=Homo sapiens GN=DSG2 PE=1 SV=2 - [DSG2_HUMAN]	13,72
Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=DRG1 PE=1 SV=1 - [DRG1_HUMAN]	6,32
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLD PE=1 SV=2 - [DLDH_HUMAN]	8,83
DNA damage-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=DDB1 PE=1 SV=1 - [DDB1_HUMAN]	5,70
DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6 PE=1 SV=1 - [MCM6_HUMAN]	5,29
DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=4 - [MCM7_HUMAN]	8,30
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=APEX1 PE=1 SV=1 - [G3V3C7_HUMAN]	2,85
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DPM1 PE=1 SV=1 - [DPM1_HUMAN]	9,18

Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4 - [DREB_HUMAN]	16,72
Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=4 - [DCTN2_HUMAN]	35,80
Dynactin subunit 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DCTN3 PE=1 SV=1 - [X6RCK5_HUMAN]	12,03
Dynactin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DCTN4 PE=1 SV=1 - [DCTN4_HUMAN]	21,71
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens GN=TRIM21 PE=1 SV=1 - [RO52_HUMAN]	14,59
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=4 - [H0YL12_HUMAN]	9,20
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]	32,00
Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens GN=EEF1A2 PE=1 SV=1 - [EF1A2_HUMAN]	25,70
Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 - [EF1G_HUMAN]	21,18
Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 - [EF2_HUMAN]	26,90
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 - [EFTU_HUMAN]	16,73
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]	17,25
Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 - [IF4A1_HUMAN]	22,33
Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1 SV=4 - [IF4A3_HUMAN]	8,24
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Homo sapiens GN=EIF2S3 PE=1 SV=3 - [IF2G_HUMAN]	4,76
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens GN=EIF3B PE=1 SV=3 - [EIF3B_HUMAN]	10,57
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens GN=EIF3I PE=1 SV=1 - [EIF3I_HUMAN]	4,19
Exportin-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1 - [XPO1_HUMAN]	5,49
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3 - [CAZA1_HUMAN]	21,89
F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=CAPZA2 PE=1 SV=3 - [CAZA2_HUMAN]	12,87
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]	4,20
Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=1 - [H3B-QN4_HUMAN]	31,40
Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=2 - [K7EQ48_HUMAN]	5,89
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 OS=Homo sapiens GN=GFPT2 PE=1 SV=3 - [GFPT2_HUMAN]	8,49
Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]	11,66
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 - [G3P_HUMAN]	36,55
GrpE protein homolog 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GRPEL1 PE=1 SV=2 - [GRPE1_HUMAN]	2,44
GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=4 - [F5H018_HUMAN]	5,00

Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=GNAI1 PE=1 SV=2 - [GNAI1_HUMAN]	7,81
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-2 OS=Homo sapiens GN=GNB2 PE=1 SV=3 - [GNB2_HUMAN]	11,05
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha OS=Homo sapiens GN=GNAI3 PE=1 SV=3 - [GNAI3_HUMAN]	10,98
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=3 - [GNB2L1_HUMAN]	23,87
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 OS=Homo sapiens GN=GNB4 PE=1 SV=3 - [GNB4_HUMAN]	16,47
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 - [HPT_HUMAN]	48,47
HCG2043239 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLV3-9 PE=1 SV=1 - [A0A-075B6K5_HUMAN]	5,50
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 - [HSP71_HUMAN]	128,08
Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4 - [HSP74_HUMAN]	23,91
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]	102,02
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]	7,60
Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 - [HS90A_HUMAN]	61,47
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]	56,04
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]	5,76
Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 - [HEMO_HUMAN]	3,84
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]	11,32
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=4 - [D6RF44_HUMAN]	8,34
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRPF_HUMAN]	13,41
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1 - [E9PCY7_HUMAN]	15,96
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1 - [A0A087WUI2_HUMAN]	8,94
Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1 - [HRG_HUMAN]	5,65
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_HUMAN]	9,98
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]	15,36
Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3 - [H2B1K_HUMAN]	4,89
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]	7,32
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]	5,84
Hsc70-interacting protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ST13 PE=1 SV=1 - [H7C3I1_HUMAN]	9,04
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=HPRT1 PE=1 SV=2 - [HPRT_HUMAN]	12,56

Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]	14,78
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [A0A087X079_HUMAN]	53,02
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]	31,39
Ig gamma-3 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=1 - [A0A075B6N8_HUMAN]	41,69
Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1 - [IGHG4_HUMAN]	18,01
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 - [A0A087X130_HUMAN]	29,83
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV302_HUMAN]	9,65
Ig lambda-2 chain C regions (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=4 SV=1 - [A0A075B6K9_HUMAN]	31,61
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=1 - [A0A087X2C0_HUMAN]	16,79
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2 - [IGLL5_HUMAN]	13,87
Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2 - [IMB1_HUMAN]	10,40
Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPA2 PE=1 SV=1 - [H0Y9D8_HUMAN]	4,02
Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens GN=PPA1 PE=1 SV=2 - [IPYR_HUMAN]	5,53
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=1 - [H0Y4R1_HUMAN]	13,65
Insulin receptor substrate 4 OS=Homo sapiens GN=IRS4 PE=1 SV=1 - [IRS4_HUMAN]	4,90
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2 - [IF2B1_HUMAN]	7,64
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=1 - [B4DY09_HUMAN]	10,40
Isoform 1 of Four and a half LIM domains protein 1 OS=Homo sapiens GN=FHL1 - [FHL1_HUMAN]	14,89
Isoform 10 of Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 - [TPM1_HUMAN]	30,12
Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 - [PSMD1_HUMAN]	5,22
Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD - [6PGD_HUMAN]	6,11
Isoform 2 of Adseverin OS=Homo sapiens GN=SCIN - [ADSV_HUMAN]	2,18
Isoform 2 of Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 - [A1AT_HUMAN]	16,35
Isoform 2 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 - [AIFM1_HUMAN]	6,03
Isoform 2 of Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=GOT1 - [AATC_HUMAN]	4,73
Isoform 2 of Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=DARS - [SYDC_HUMAN]	9,51
Isoform 2 of ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 - [ATPA_HUMAN]	21,29

Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X - [DDX3X_HUMAN]	10,26
Isoform 2 of Band 4.1-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=EPB41L5 - [E41L5_HUMAN]	3,83
Isoform 2 of Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens GN=A-TIC - [PUR9_HUMAN]	7,12
Isoform 2 of Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A - [CO4A_HUMAN]	19,52
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Homo sapiens GN=EIF3C - [EIF3C_HUMAN]	6,88
Isoform 2 of Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN - [GELS_HUMAN]	10,91
Isoform 2 of Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Homo sapiens GN=GFPT1 - [GFPT1_HUMAN]	12,11
Isoform 2 of GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Homo sapiens GN=GMPS - [GUAA_HUMAN]	4,52
Isoform 2 of Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN - [GRN_HUMAN]	4,02
Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 - [GBB1_HUMAN]	14,83
Isoform 2 of Hamartin OS=Homo sapiens GN=TSC1 - [TSC1_HUMAN]	32,85
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNR-NPA1 - [ROA1_HUMAN]	10,70
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNR-NPL - [HNRPL_HUMAN]	9,13
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNR-NPM - [HNRPM_HUMAN]	14,79
Isoform 2 of Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 - [IPO5_HUMAN]	8,34
Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 - [DDX21_HUMAN]	5,58
Isoform 2 of Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 - [PGK1_HUMAN]	21,95
Isoform 2 of Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 - [SERC_HUMAN]	13,25
Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 - [DDX17_HUMAN]	7,92
Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 - [DDX5_HUMAN]	12,72
Isoform 2 of Protein flightless-1 homolog OS=Homo sapiens GN=FLII - [FLII_HUMAN]	12,55
Isoform 2 of Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS - [PSA_HUMAN]	6,07
Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]	7,60
Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 - [GDIB_HUMAN]	9,52
Isoform 2 of RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 - [RUVB2_HUMAN]	6,85
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 - [TCPE_HUMAN]	17,92
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 - [TCPQ_HUMAN]	20,32
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A - [TCPZ_HUMAN]	14,85

Isoform 2 of Telomere-associated protein RIF1 OS=Homo sapiens GN=RIF1 - [RIF1_HUMAN]	22,74
Isoform 2 of Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXNDC5 - [TXNDC5_HUMAN]	14,84
Isoform 2 of Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN - [THIO_HUMAN]	4,22
Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 - [PRDX3_HUMAN]	9,12
Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]	40,14
Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 - [TPM3_HUMAN]	73,83
Isoform 2 of Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=WARS - [SYWC_HUMAN]	14,31
Isoform 2 of Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A - [TBA1A_HUMAN]	69,33
Isoform 2 of Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA4A - [TBA4A_HUMAN]	51,34
Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 - [UBA1_HUMAN]	43,58
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens GN=MYO1B - [MYO1B_HUMAN]	38,26
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C - [MYO1C_HUMAN]	44,07
Isoform 2 of YTH domain-containing family protein 2 OS=Homo sapiens GN=YTHDF2 - [YTHD2_HUMAN]	10,68
Isoform 3 of ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=ATAD3A - [ATD3A_HUMAN]	15,06
Isoform 3 of ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY - [ACLY_HUMAN]	4,85
Isoform 3 of Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens GN=CACYBP - [CYBP_HUMAN]	15,18
Isoform 3 of Cofilin-2 OS=Homo sapiens GN=CFL2 - [COF2_HUMAN]	5,56
Isoform 3 of Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DCTN1 - [DCTN1_HUMAN]	69,53
Isoform 3 of Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L - [XPO2_HUMAN]	13,11
Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK - [HNRPK_HUMAN]	22,36
Isoform 3 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRRFIP2 - [LRRF2_HUMAN]	6,07
Isoform 3 of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 OS=Homo sapiens GN=MAP3K6 - [M3K6_HUMAN]	9,95
Isoform 3 of Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 - [NPM_HUMAN]	7,25
Isoform 3 of Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 - [PLST_HUMAN]	24,12
Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 - [PDIA6_HUMAN]	9,13
Isoform 3 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 - [LC7L2_HUMAN]	7,51
Isoform 3 of Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SHMT2 - [GLYM_HUMAN]	17,42
Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 - [AT1A1_HUMAN]	4,85
Isoform 3 of Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 - [STIP1_HUMAN]	4,86

Isoform 3 of TBC1 domain family member 7 OS=Homo sapiens GN=TBC1D7 - [TBCD7_HUMAN]	14,60
Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 - [TCPH_HUMAN]	20,57
Isoform 3 of Tyrosine-protein kinase Fyn OS=Homo sapiens GN=FYN - [FYN_HUMAN]	6,96
Isoform 4 of Ankycorbin OS=Homo sapiens GN=RAI14 - [RAI14_HUMAN]	11,82
Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYN-CRIP - [HNRPQ_HUMAN]	11,64
Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 - [PAIRB_HUMAN]	13,70
Isoform 5 of Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens GN=ILF3 - [ILF3_HUMAN]	4,38
Isoform 6 of Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 - [PCBP2_HUMAN]	7,79
Isoform 7 of Tuberin OS=Homo sapiens GN=TSC2 - [TSC2_HUMAN]	26,25
Isoform Beta of Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 - [HS105_HUMAN]	12,40
Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=FH - [FUMH_HUMAN]	6,25
Isoform Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 - [PRDX5_HUMAN]	7,24
Isoform DeltaLf of Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF - [TRFL_HUMAN]	4,54
Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS - [SYRC_HUMAN]	5,24
Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB - [1433B_HUMAN]	17,96
Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU - [HNRPU_HUMAN]	6,73
Isoform Short of Protein C21orf2 OS=Homo sapiens GN=C21orf2 - [CU002_HUMAN]	11,62
Isoform SV of 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE - [1433E_HUMAN]	19,40
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=IARS PE=1 SV=1 - [J3KR24_HUMAN]	8,69
Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]	14,74
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	128,79
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	44,51
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]	50,07
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [K1C17_HUMAN]	18,85
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	82,06
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	187,25
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	130,31
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	46,86

Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]	45,04
Keratin, type II cytoskeletal 74 OS=Homo sapiens GN=KRT74 PE=1 SV=2 - [K2C74_HUMAN]	18,30
Keratin, type II cytoskeletal 8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=1 - [F8VUG2_HUMAN]	12,51
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LR-PPRC PE=1 SV=3 - [LPPRC_HUMAN]	12,16
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRRC59 PE=1 SV=1 - [LRC59_HUMAN]	7,25
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=LARS PE=1 SV=2 - [SYLC_HUMAN]	7,75
Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H PE=1 SV=2 - [LKHA4_HUMAN]	9,07
Liprin-beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPFIBP1 PE=1 SV=1 - [F5GZP6_HUMAN]	10,73
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]	19,68
L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]	44,51
Lupus La protein OS=Homo sapiens GN=SSB PE=1 SV=2 - [LA_HUMAN]	11,77
Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3 - [SYK_HUMAN]	8,37
Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MDH1 PE=1 SV=1 - [C9JF79_HUMAN]	6,58
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3 - [MDHM_HUMAN]	33,28
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MARS PE=1 SV=2 - [SYMC_HUMAN]	5,50
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens GN=MA-PRE1 PE=1 SV=3 - [MARE1_HUMAN]	5,08
Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BUB3 PE=1 SV=1 - [J3QT28_HUMAN]	5,77
Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3 - [MOES_HUMAN]	5,24
Multifunctional protein ADE2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=1 - [E9PBS1_HUMAN]	15,82
Myosin light chain 6B OS=Homo sapiens GN=MYL6B PE=1 SV=1 - [MYL6B_HUMAN]	13,49
Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1 - [F8W1R7_HUMAN]	31,27
Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MPRIP PE=1 SV=1 - [J3KSW8_HUMAN]	7,99
Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=2 - [ML12A_HUMAN]	55,86
Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3 - [MYH10_HUMAN]	79,31
Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4 - [MYH9_HUMAN]	107,00
N-alpha-acetyltransferase 50 OS=Homo sapiens GN=NAA50 PE=1 SV=1 - [A0A087WWJ2_HUMAN]	5,02
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NACA PE=1 SV=1 - [F8W1N5_HUMAN]	7,25
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 OS=Homo sapiens GN=UBE2M PE=1 SV=1 - [UBC12_HUMAN]	4,59

Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=1 - [F5H6X6_HUMAN]	9,88
Non-POU domain-containing octamer-binding protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=1 - [C9IZL7_HUMAN]	2,02
Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1 - [NUDC_HUMAN]	1,65
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=1 - [A0A087X1S2_HUMAN]	7,21
Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 - [NUCL_HUMAN]	27,07
Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]	9,12
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=1 SV=1 - [F8VRJ2_HUMAN]	3,87
Nucleosome assembly protein 1-like 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NAP1L4 PE=1 SV=2 - [A8MXH2_HUMAN]	5,57
Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=OLA1 PE=1 SV=2 - [OLA1_HUMAN]	2,88
Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OAT PE=1 SV=1 - [OAT_HUMAN]	13,29
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]	20,13
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 - [PPIB_HUMAN]	4,56
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3 - [FKBP4_HUMAN]	16,31
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 OS=Homo sapiens GN=PPIL4 PE=1 SV=1 - [PPIL4_HUMAN]	6,42
Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]	36,11
Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 - [PRDX2_HUMAN]	11,66
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]	79,89
Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]	10,74
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=1 SV=3 - [E7ER27_HUMAN]	5,34
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=3 - [SYFB_HUMAN]	4,00
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 - [PEBP1_HUMAN]	14,90
Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2 - [PGAM1_HUMAN]	13,46
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4 - [PARP1_HUMAN]	30,21
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (Inducible form), isoform CRA_e OS=Homo sapiens GN=PABPC4 PE=1 SV=1 - [B1ANR0_HUMAN]	4,84
Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MTPAP PE=1 SV=1 - [PAPD1_HUMAN]	16,83
Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 - [PCBP1_HUMAN]	8,23
Polyadenylate-binding protein OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=1 SV=1 - [A0A087WTT1_HUMAN]	9,51
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PTBP1 PE=1 SV=1 - [A0A087WU68_HUMAN]	6,97

Polyubiquitin-B (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=1 SV=1 - [J3QSA3_HUMAN]	11,56
POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=1 SV=3 - [POTEE_HUMAN]	85,52
Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens GN=PRPF19 PE=1 SV=1 - [PRP19_HUMAN]	8,13
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 OS=Homo sapiens GN=DDX41 PE=1 SV=2 - [DDX41_HUMAN]	15,94
Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]	14,56
Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens GN=PDCD6IP PE=1 SV=1 - [PDC6I_HUMAN]	6,03
Prohibitin OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1 - [PHB_HUMAN]	9,49
Prohibitin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2 - [F5H3X6_HUMAN]	11,61
Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]	4,65
Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1 - [PCNA_HUMAN]	8,94
Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3 - [PA2G4_HUMAN]	20,23
Proteasome subunit alpha type OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1 - [G3V3U4_HUMAN]	6,45
Proteasome subunit beta type-5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=1 - [H0YJM8_HUMAN]	5,03
Protein ARPC4-TTLL3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARPC4-TTLL3 PE=1 SV=1 - [H7C0A3_HUMAN]	4,20
Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4 - [PDIA3_HUMAN]	4,30
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 - [PDIA1_HUMAN]	13,28
Protein IGKV3-11 OS=Homo sapiens GN=IGKV3-11 PE=4 SV=1 - [A0A087WZW8_HUMAN]	30,23
Protein LTV1 homolog OS=Homo sapiens GN=LTV1 PE=1 SV=1 - [LTV1_HUMAN]	6,15
Protein RCC2 OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=1 SV=2 - [RCC2_HUMAN]	3,42
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]	7,82
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=4 - [PIMT_HUMAN]	14,19
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2 - [DHX15_HUMAN]	7,74
Putative Ras-related protein Rab-1C OS=Homo sapiens GN=RAB1C PE=5 SV=2 - [RAB1C_HUMAN]	9,30
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 PE=1 SV=1 - [Q5JPU0_HUMAN]	4,59
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	49,22
Ran GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RANGAP1 PE=1 SV=1 - [RAGP1_HUMAN]	6,77
Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RANBP1 PE=1 SV=1 - [C9JJ34_HUMAN]	4,62
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1 - [G3BP1_HUMAN]	15,64
Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens GN=RAB5C PE=1 SV=2 - [RAB5C_HUMAN]	4,29

Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 - [RAB7A_HUMAN]	9,59
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIA PE=1 SV=1 - [J3KRE2_HUMAN]	6,61
Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens GN=RNH1 PE=1 SV=2 - [RINI_HUMAN]	11,12
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Homo sapiens GN=PRPS1 PE=1 SV=1 - [B1ALA9_HUMAN]	24,71
Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=1 - [E7EX53_HUMAN]	6,06
RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1 - [RUVB1_HUMAN]	23,32
Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEPT2 PE=1 SV=1 - [B5MCX3_HUMAN]	5,27
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CA PE=1 SV=1 - [PP1A_HUMAN]	17,88
Serine-threonine kinase receptor-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STRAP PE=1 SV=1 - [H0YH33_HUMAN]	5,01
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]	46,29
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]	266,93
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens GN=SNRPD2 PE=1 SV=1 - [K7ERG4_HUMAN]	6,20
Spermidine synthase OS=Homo sapiens GN=SRM PE=1 SV=1 - [SPEE_HUMAN]	4,99
Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens GN=DDX39B PE=1 SV=1 - [DX39B_HUMAN]	7,73
Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 - [SFPQ_HUMAN]	15,19
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SND1 PE=1 SV=1 - [SND1_HUMAN]	5,37
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]	62,57
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=1 SV=2 - [SBSN_HUMAN]	5,46
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]	21,95
T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=1 - [F8VQ14_HUMAN]	20,93
T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4 - [TCPD_HUMAN]	27,12
T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=1 - [B4DUR8_HUMAN]	20,09
Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=1 - [F2Z393_HUMAN]	5,96
Transcription intermediary factor 1-beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TRIM28 PE=1 SV=1 - [M0R0K9_HUMAN]	8,09
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=TACC3 PE=1 SV=1 - [TACC3_HUMAN]	8,51
Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=1 - [X6RJP6_HUMAN]	7,78
Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]	13,55
Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=1 - [A0A0B4J1R6_HUMAN]	17,61
Translin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TSN PE=1 SV=1 - [H7C1D4_HUMAN]	6,64

Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]	21,65
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=1 SV=1 - [B5MD38_HUMAN]	5,79
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=GART PE=1 SV=1 - [PUR2_HUMAN]	18,82
Tropomodulin-3 OS=Homo sapiens GN=TMOD3 PE=1 SV=1 - [TMOD3_HUMAN]	16,50
Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=2 - [F5H7S3_HUMAN]	30,42
Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3 - [TPM4_HUMAN]	24,43
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 - [TBB5_HUMAN]	84,71
Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 - [TBB2A_HUMAN]	61,10
Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1 - [TBB2B_HUMAN]	61,67
Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 - [TBB4B_HUMAN]	68,38
Tubulin-folding cofactor B (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TBCB PE=1 SV=4 - [K7EP07_HUMAN]	1,94
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=YARS PE=1 SV=4 - [SYYC_HUMAN]	11,83
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=1 SV=1 - [D6R974_HUMAN]	8,84
Unconventional myosin-IId OS=Homo sapiens GN=MYO1D PE=1 SV=2 - [MYO1D_HUMAN]	46,82
Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2 - [VPS35_HUMAN]	5,46
Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=1 - [B0YJC4_HUMAN]	26,09
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1 - [VTDB_HUMAN]	6,88
X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3 - [XRCC5_HUMAN]	10,08
X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=2 - [XRCC6_HUMAN]	11,09

Anexo 8.3.2. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células tratadas con NAM

Description	Score
10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2 - [CH10_HUMAN]	7,01
14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4 - [1433F_HUMAN]	14,71
14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 - [1433G_HUMAN]	15,11
14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 - [1433T_HUMAN]	21,87
14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]	27,53
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSMD1 PE=1 SV=1 - [H7C378_HUMAN]	7,48
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens GN=PSMD11 PE=1 SV=3 - [PSD11_HUMAN]	8,41
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Homo sapiens GN=PSMD13 PE=1 SV=1 - [J3KNQ3_HUMAN]	2,52
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=1 - [Q5H928_HUMAN]	13,84
40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1 - [RS10_HUMAN]	12,93
40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3 - [RS11_HUMAN]	6,87
40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3 - [RS12_HUMAN]	1,61
40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=1 - [J3KMX5_HUMAN]	12,27
40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3 - [RS14_HUMAN]	13,32
40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=1 - [I3L3P7_HUMAN]	7,11
40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=1 - [M0R210_HUMAN]	17,73
40S ribosomal protein S17-like OS=Homo sapiens GN=RPS17L PE=1 SV=1 - [RS17L_HUMAN]	15,58
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3 - [RS18_HUMAN]	30,25
40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2 - [RS19_HUMAN]	11,03
40S ribosomal protein S2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=1 - [H0YEN5_HUMAN]	26,94
40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1 - [RS20_HUMAN]	6,97
40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens GN=RPS23 PE=1 SV=3 - [RS23_HUMAN]	3,36
40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1 - [RS25_HUMAN]	18,38

40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=1 SV=3 - [RS26_HUMAN]	8,64
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]	39,49
40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=4 - [D6RB09_HUMAN]	13,78
40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 - [RS4X_HUMAN]	32,37
40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1 - [M0R0F0_HUMAN]	15,15
40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 - [RS7_HUMAN]	9,64
40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2 - [RS8_HUMAN]	31,85
40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3 - [RS9_HUMAN]	13,62
40S ribosomal protein SA (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4 - [C9J9K3_HUMAN]	21,35
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]	50,46
60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 - [F8V-QY6_HUMAN]	7,84
60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1 - [RLA2_HUMAN]	3,99
60S ribosomal protein L10 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=1 - [H7C123_HUMAN]	4,37
60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1 SV=2 - [RL10A_HUMAN]	4,82
60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1 - [RL12_HUMAN]	10,06
60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=4 - [RL13_HUMAN]	9,86
60S ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=2 - [RL15_HUMAN]	7,29
60S ribosomal protein L17 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL17 PE=1 SV=2 - [A0A087WY81_HUMAN]	6,21
60S ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=1 - [F8VUA6_HUMAN]	7,34
60S ribosomal protein L21 OS=Homo sapiens GN=RPL21 PE=1 SV=2 - [RL21_HUMAN]	5,23
60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1 - [RL23_HUMAN]	18,57
60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1 - [C9JXB8_HUMAN]	4,52
60S ribosomal protein L26 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL26 PE=4 SV=4 - [J3KTJ8_HUMAN]	4,74
60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2 - [RL27_HUMAN]	7,87
60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=1 - [E9PLL6_HUMAN]	9,83
60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=1 - [F8WCR1_HUMAN]	4,62
60S ribosomal protein L31 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=1 SV=1 - [H7C2W9_HUMAN]	7,07

60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=1 - [F2Z388_HUMAN]	5,65
60S ribosomal protein L37a OS=Homo sapiens GN=RPL37A PE=1 SV=1 - [C9J4Z3_HUMAN]	3,65
60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens GN=RPL38 PE=1 SV=1 - [J3KT73_HUMAN]	6,62
60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5 - [RL4_HUMAN]	30,85
60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3 - [RL5_HUMAN]	12,77
60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 - [RL6_HUMAN]	18,47
60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1 - [A8MUD9_HUMAN]	16,10
60S ribosomal protein L7a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=1 - [Q5T8U3_HUMAN]	5,97
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	69,28
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACAT1 PE=1 SV=1 - [THIL_HUMAN]	5,42
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=ANP32A PE=1 SV=1 - [H0YN26_HUMAN]	5,86
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 - [ACTC_HUMAN]	97,91
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	190,12
Actin-related protein 10 OS=Homo sapiens GN=ACTR10 PE=1 SV=1 - [ARP10_HUMAN]	8,87
Actin-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTR2 PE=1 SV=1 - [ARP2_HUMAN]	4,92
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_HUMAN]	8,93
Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTR3 PE=1 SV=3 - [ARP3_HUMAN]	5,86
Acylglycerol kinase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AGK PE=1 SV=1 - [E9PG39_HUMAN]	5,68
Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4 - [SAHH_HUMAN]	20,89
ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	17,84
ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4 - [ADT3_HUMAN]	15,07
ADP-ribosylation factor 3 OS=Homo sapiens GN=ARF3 PE=1 SV=2 - [ARF3_HUMAN]	9,49
ADP-ribosylation factor 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARF4 PE=1 SV=1 - [C9JPM4_HUMAN]	4,89
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=AARS PE=1 SV=2 - [SYAC_HUMAN]	15,56
Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=1 - [E9PCX2_HUMAN]	4,18
Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1 - [A1AG1_HUMAN]	4,98
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 - [FETUA_HUMAN]	10,82
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 - [ACTN4_HUMAN]	78,46
Alpha-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1A PE=1 SV=1 - [ACTZ_HUMAN]	49,08
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]	87,31

Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 OS=Homo sapiens GN=AIMP2 PE=1 SV=2 - [AIMP2_HUMAN]	5,71
Angiomotin OS=Homo sapiens GN=AMOT PE=1 SV=1 - [E7ERM3_HUMAN]	24,55
Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=1 - [H0YMM1_HUMAN]	22,43
Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=1 - [D6RBE9_HUMAN]	2,54
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 - [APOA1_HUMAN]	21,06
Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1 - [APOD_HUMAN]	6,63
Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=1 SV=3 - [AATM_HUMAN]	9,92
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]	34,87
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]	39,45
ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5O PE=1 SV=1 - [ATPO_HUMAN]	8,54
ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4 - [DHX9_HUMAN]	15,02
ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens GN=DDX39A PE=1 SV=2 - [DX39A_HUMAN]	6,10
Beta-actin OS=Homo sapiens GN=ACTR1B PE=1 SV=1 - [ACTY_HUMAN]	27,19
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=EPRS PE=1 SV=5 - [SYEP_HUMAN]	15,31
Biliverdin reductase A OS=Homo sapiens GN=BLVRA PE=1 SV=2 - [BIEA_HUMAN]	4,91
Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens GN=BASP1 PE=1 SV=2 - [BASP1_HUMAN]	7,63
BTB/POZ domain-containing protein KCTD12 OS=Homo sapiens GN=KCTD12 PE=1 SV=1 - [KCD12_HUMAN]	6,54
Bystin OS=Homo sapiens GN=BYSL PE=1 SV=3 - [BYST_HUMAN]	3,45
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3 - [C1TC_HUMAN]	30,45
Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2 - [CALX_HUMAN]	8,52
Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1 - [CALR_HUMAN]	18,80
Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=1 SV=1 - [B1AK87_HUMAN]	25,15
Caprin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CAPRIN1 PE=1 SV=1 - [E9PLA9_HUMAN]	20,93
Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=1 SV=3 - [CBR1_HUMAN]	13,43
Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA_HUMAN]	5,58
Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC42 PE=1 SV=2 - [CDC42_HUMAN]	10,44
Cell growth-regulating nucleolar protein OS=Homo sapiens GN=LYAR PE=1 SV=2 - [LYAR_HUMAN]	8,63
Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 - [CLIC1_HUMAN]	11,91
Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=1 - [G3V1A4_HUMAN]	18,57
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]	26,73
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1 - [F5GXS0_HUMAN]	7,23

Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1 - [C1QBP_HUMAN]	7,06
Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1 - [KCRB_HUMAN]	39,35
Cyclin-dependent kinase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CDK1 PE=1 SV=2 - [E5RIU6_HUMAN]	7,24
Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]	11,17
Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=CHORDC1 PE=1 SV=2 - [CHRD1_HUMAN]	4,45
Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]	4,97
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]	21,51
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	5,40
Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 - [DSG1_HUMAN]	6,61
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLD PE=1 SV=2 - [DLDH_HUMAN]	10,28
DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6 PE=1 SV=1 - [MCM6_HUMAN]	5,06
DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=4 - [MCM7_HUMAN]	13,73
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase OS=Homo sapiens GN=APEX1 PE=1 SV=2 - [APEX1_HUMAN]	12,79
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DPM1 PE=1 SV=1 - [DPM1_HUMAN]	6,52
Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4 - [DREB_HUMAN]	31,71
Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=4 - [DCTN2_HUMAN]	51,64
Dynactin subunit 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DCTN3 PE=1 SV=1 - [X6RCK5_HUMAN]	7,09
Dynactin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DCTN4 PE=1 SV=1 - [DCTN4_HUMAN]	22,21
Dynactin subunit 6 OS=Homo sapiens GN=DCTN6 PE=1 SV=1 - [E5RK00_HUMAN]	4,56
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens GN=TRIM21 PE=1 SV=1 - [RO52_HUMAN]	9,17
EF-hand domain-containing protein D1 OS=Homo sapiens GN=EFHD1 PE=1 SV=1 - [EFHD1_HUMAN]	4,29
EF-hand domain-containing protein D2 OS=Homo sapiens GN=EFHD2 PE=1 SV=1 - [EFHD2_HUMAN]	9,70
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=4 - [H0YL12_HUMAN]	10,96
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]	49,52
Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 - [EF1G_HUMAN]	26,36
Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 - [EF2_HUMAN]	50,98
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 - [EFTU_HUMAN]	26,28
Emerin OS=Homo sapiens GN=EMD PE=1 SV=1 - [Q5HY57_HUMAN]	4,19
Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]	25,23
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECHS1 PE=1 SV=4 - [ECHM_HUMAN]	8,07

Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 - [IF4A1_HUMAN]	29,31
Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1 SV=4 - [IF4A3_HUMAN]	8,75
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens GN=EIF3B PE=1 SV=3 - [EIF3B_HUMAN]	13,43
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens GN=EIF3E PE=1 SV=1 - [EIF3E_HUMAN]	5,25
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens GN=EIF3I PE=1 SV=1 - [EIF3I_HUMAN]	4,81
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens GN=EIF3L PE=1 SV=1 - [B0QY90_HUMAN]	2,01
Exportin-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1 - [XPO1_HUMAN]	5,18
Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=3 - [E7EQR4_HUMAN]	12,15
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3 - [CAZA1_HUMAN]	18,57
F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=CAPZA2 PE=1 SV=3 - [CAZA2_HUMAN]	13,66
Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUBP1 PE=1 SV=3 - [FUBP1_HUMAN]	4,85
Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=1 - [A0A087WTP3_HUMAN]	13,02
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]	5,78
Flap endonuclease 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FEN1 PE=1 SV=1 - [F5H1Y3_HUMAN]	4,25
Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 - [ALDOA_HUMAN]	41,45
Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Homo sapiens GN=ALDOC PE=1 SV=2 - [ALDOC_HUMAN]	5,53
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1 - [Q5T0H8_HUMAN]	8,39
Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=2 - [K7EQ48_HUMAN]	5,75
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 OS=Homo sapiens GN=GFPT2 PE=1 SV=3 - [GFPT2_HUMAN]	11,35
Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]	11,87
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 - [G3P_HUMAN]	47,09
Glycine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=GARS PE=1 SV=3 - [SYG_HUMAN]	4,27
GrpE protein homolog 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GRPEL1 PE=1 SV=2 - [GRPE1_HUMAN]	5,30
GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=4 - [F5H018_HUMAN]	5,47
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha OS=Homo sapiens GN=GNAI3 PE=1 SV=3 - [GNAI3_HUMAN]	7,93
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=1 - [J3KPE3_HUMAN]	30,21
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 OS=Homo sapiens GN=GNB4 PE=1 SV=3 - [GBB4_HUMAN]	9,85

HCG2043239 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLV3-9 PE=1 SV=1 - [A0A-075B6K5_HUMAN]	5,24
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 - [HSP71_HUMAN]	152,02
Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4 - [HSP74_HUMAN]	23,88
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]	130,55
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]	9,26
Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 - [HS90A_HUMAN]	95,06
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]	99,52
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]	14,97
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=4 - [D6RF44_HUMAN]	13,81
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRPF_HUMAN]	14,24
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1 - [E9PCY7_HUMAN]	23,26
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP PE=1 SV=1 - [B7Z645_HUMAN]	8,87
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_HUMAN]	7,42
Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2 - [H2A1B_HUMAN]	21,89
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]	23,33
Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3 - [H2B1J_HUMAN]	12,72
Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3 - [H2B1K_HUMAN]	14,66
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]	11,18
Histone-binding protein RBBP7 OS=Homo sapiens GN=RBBP7 PE=1 SV=1 - [E9PC52_HUMAN]	4,90
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]	13,57
Hsc70-interacting protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ST13 PE=1 SV=1 - [H7C3I1_HUMAN]	6,58
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=HPRT1 PE=1 SV=2 - [HPRT_HUMAN]	11,66
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]	10,17
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [A0A087W-YE1_HUMAN]	49,88
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]	36,03
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 - [IGKC_HUMAN]	26,69
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV302_HUMAN]	8,07

Ig lambda-2 chain C regions (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=4 SV=1 - [A0A075B6K9_HUMAN]	17,52
Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [MUCB_HUMAN]	6,53
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=1 SV=1 - [A0A087WWC9_HUMAN]	9,96
Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=KPNA2 PE=1 SV=1 - [IMA1_HUMAN]	4,83
Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2 - [IMB1_HUMAN]	19,66
Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens GN=PPA1 PE=1 SV=2 - [IPYR_HUMAN]	5,45
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=1 - [H0Y4R1_HUMAN]	8,22
Insulin receptor substrate 4 OS=Homo sapiens GN=IRS4 PE=1 SV=1 - [IRS4_HUMAN]	8,54
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2 - [IF2B1_HUMAN]	14,39
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=1 - [B4DY09_HUMAN]	9,37
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=IDH1 PE=1 SV=2 - [IDHC_HUMAN]	5,12
Isoform 1 of Four and a half LIM domains protein 1 OS=Homo sapiens GN=FHL1 - [FHL1_HUMAN]	21,48
Isoform 1 of Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL - [VINC_HUMAN]	10,02
Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 - [PRS7_HUMAN]	5,14
Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 8 OS=Homo sapiens GN=PSMC5 - [PRS8_HUMAN]	6,33
Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens GN=RPS24 - [RS24_HUMAN]	5,96
Isoform 2 of 60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 - [RL11_HUMAN]	9,30
Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD - [6PGD_HUMAN]	8,18
Isoform 2 of Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 - [A1AT_HUMAN]	12,03
Isoform 2 of Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 - [ACTN1_HUMAN]	29,60
Isoform 2 of Annexin A6 OS=Homo sapiens GN=ANXA6 - [ANXA6_HUMAN]	15,38
Isoform 2 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 - [AIFM1_HUMAN]	6,63
Isoform 2 of Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=DARS - [SYDC_HUMAN]	7,39
Isoform 2 of ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY - [ACLY_HUMAN]	14,11
Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X - [DDX3X_HUMAN]	21,92
Isoform 2 of Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens GN=ATIC - [PUR9_HUMAN]	12,22
Isoform 2 of BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207 OS=Homo sapiens GN=ZNF207 - [ZN207_HUMAN]	4,68
Isoform 2 of Cellular nucleic acid-binding protein OS=Homo sapiens GN=CNBP - [CNBP_HUMAN]	6,91
Isoform 2 of Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=CLTC - [CLH1_HUMAN]	26,27
Isoform 2 of CTP synthase 1 OS=Homo sapiens GN=CTPS1 - [PYRG1_HUMAN]	9,78

Isoform 2 of Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAND1 - [CAND1_HUMAN]	9,15
Isoform 2 of D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDT - [DOPD_HUMAN]	5,33
Isoform 2 of Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 OS=Homo sapiens GN=ETF1 - [ERF1_HUMAN]	5,28
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Homo sapiens GN=EIF3C - [EIF3C_HUMAN]	9,18
Isoform 2 of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=FXR1 - [FXR1_HUMAN]	4,61
Isoform 2 of Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Homo sapiens GN=GFPT1 - [GFPT1_HUMAN]	13,45
Isoform 2 of Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN - [GRN_HUMAN]	4,30
Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 - [GBB1_HUMAN]	8,04
Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens GN=GNL3 - [GNL3_HUMAN]	4,09
Isoform 2 of Hamartin OS=Homo sapiens GN=TSC1 - [TSC1_HUMAN]	28,85
Isoform 2 of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP - [HPT_HUMAN]	31,18
Isoform 2 of Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 - [TRAP1_HUMAN]	7,01
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 - [ROA1_HUMAN]	23,80
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM - [HNRPM_HUMAN]	16,98
Isoform 2 of Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 - [IPO5_HUMAN]	6,74
Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 - [K2C78_HUMAN]	5,12
Isoform 2 of Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens GN=GLO1 - [LGUL_HUMAN]	4,77
Isoform 2 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRRFIP2 - [LRRF2_HUMAN]	8,29
Isoform 2 of Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 - [MDHC_HUMAN]	9,08
Isoform 2 of NAD(P)H-hydrate epimerase OS=Homo sapiens GN=APOA1BP - [NNRE_HUMAN]	8,94
Isoform 2 of Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO - [NONO_HUMAN]	19,21
Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 - [DDX21_HUMAN]	12,66
Isoform 2 of Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 - [PGK1_HUMAN]	28,93
Isoform 2 of Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 - [SERC_HUMAN]	9,64
Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 - [DDX17_HUMAN]	11,35
Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 - [DDX5_HUMAN]	16,17
Isoform 2 of Protein flightless-1 homolog OS=Homo sapiens GN=FLII - [FLII_HUMAN]	11,38
Isoform 2 of Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS - [PSA_HUMAN]	5,24

Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]	10,64
Isoform 2 of RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 - [RUVB1_HUMAN]	16,53
Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2CA - [PP2AA_HUMAN]	5,20
Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens GN=SNRPD2 - [SMD2_HUMAN]	4,25
Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens GN=SNRPD3 - [SMD3_HUMAN]	7,80
Isoform 2 of Stomatin-like protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=STOML2 - [STML2_HUMAN]	4,13
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 - [TCPE_HUMAN]	18,96
Isoform 2 of Telomere-associated protein RIF1 OS=Homo sapiens GN=RIF1 - [RIF1_HUMAN]	14,16
Isoform 2 of Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXNDC5 - [TXND5_HUMAN]	10,40
Isoform 2 of Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN - [THIO_HUMAN]	4,83
Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 - [PRDX3_HUMAN]	7,23
Isoform 2 of Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=TRIM28 - [TIF1B_HUMAN]	17,61
Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]	43,33
Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 - [TPM3_HUMAN]	57,99
Isoform 2 of Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A - [TBA1A_HUMAN]	86,94
Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 - [UBA1_HUMAN]	47,58
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens GN=MYO1B - [MYO1B_HUMAN]	33,06
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C - [MYO1C_HUMAN]	30,30
Isoform 2 of Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Homo sapiens GN=VTA1 - [VTA1_HUMAN]	8,50
Isoform 2 of Y-box-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=YBX3 - [YBOX3_HUMAN]	6,16
Isoform 2 of YTH domain-containing family protein 2 OS=Homo sapiens GN=YTHDF2 - [YTHD2_HUMAN]	8,11
Isoform 3 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSMD2 - [PSMD2_HUMAN]	9,24
Isoform 3 of ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=ATAD3A - [ATD3A_HUMAN]	8,85
Isoform 3 of Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens GN=CACYBP - [CYBP_HUMAN]	13,65
Isoform 3 of Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DCTN1 - [DCTN1_HUMAN]	81,10
Isoform 3 of Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L - [XPO2_HUMAN]	13,64
Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK - [HNRPK_HUMAN]	30,40

Isoform 3 of Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens GN=ACP1 - [PPAC_HUMAN]	4,53
Isoform 3 of Myosin phosphatase Rho-interacting protein OS=Homo sapiens GN=M-PRIP - [MPRIP_HUMAN]	6,60
Isoform 3 of Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 - [NPM_HUMAN]	12,87
Isoform 3 of Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 - [NDKB_HUMAN]	11,40
Isoform 3 of Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 - [PLST_HUMAN]	22,71
Isoform 3 of Prostaglandin E synthase 3 OS=Homo sapiens GN=PTGES3 - [TEBP_HUMAN]	5,56
Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 - [PDIA6_HUMAN]	8,12
Isoform 3 of Protein enabled homolog OS=Homo sapiens GN=ENAH - [ENAH_HUMAN]	41,60
Isoform 3 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 - [LC7L2_HUMAN]	7,48
Isoform 3 of Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=S-HMT2 - [GLYM_HUMAN]	12,83
Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 - [AT1A1_HUMAN]	12,15
Isoform 3 of Src substrate cortactin OS=Homo sapiens GN=CTTN - [SRC8_HUMAN]	3,45
Isoform 3 of Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 - [STIP1_HUMAN]	7,43
Isoform 3 of TBC1 domain family member 7 OS=Homo sapiens GN=TBC1D7 - [TBCD7_HUMAN]	15,14
Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 - [TCPH_HUMAN]	18,98
Isoform 3 of Transportin-1 OS=Homo sapiens GN=TNPO1 - [TNPO1_HUMAN]	4,92
Isoform 3 of Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=Z-C3HAV1 - [ZCCHV_HUMAN]	5,26
Isoform 4 of 60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens GN=RPL28 - [RL28_HUMAN]	3,85
Isoform 4 of Ankycorbin OS=Homo sapiens GN=RAI14 - [RAI14_HUMAN]	8,51
Isoform 4 of ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5J2 - [ATPK_HUMAN]	5,51
Isoform 4 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H - [LKHA4_HUMAN]	4,58
Isoform 4 of Multiple myeloma tumor-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=MM-TAG2 - [MMTA2_HUMAN]	5,45
Isoform 4 of Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Homo sapiens GN=NASP - [NASP_HUMAN]	3,99
Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 - [PAIRB_HUMAN]	6,07
Isoform 5 of Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens GN=ILF3 - [ILF3_HUMAN]	4,28
Isoform 5 of RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 - [RBM14_HUMAN]	7,20
Isoform 6 of Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 - [PCBP2_HUMAN]	5,02
Isoform 7 of Tuberin OS=Homo sapiens GN=TSC2 - [TSC2_HUMAN]	16,36

Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 - [ROA2_HUMAN]	7,58
Isoform Beta of Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 - [HS105_HUMAN]	9,75
Isoform DPII of Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP - [DESP_HUMAN]	6,89
Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS - [SYRC_HUMAN]	2,19
Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB - [1433B_HUMAN]	19,07
Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU - [HNRPU_HUMAN]	22,94
Isoform Short of Protein C21orf2 OS=Homo sapiens GN=C21orf2 - [CU002_HUMAN]	14,67
Isoform Short of RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS - [FUS_HUMAN]	15,31
Isoform SV of 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE - [1433E_HUMAN]	26,71
Isoform Zeta of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens GN=TMPO - [LAP2B_HUMAN]	7,12
Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]	5,82
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	150,29
Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=1 - [K7ERE3_HUMAN]	37,84
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	59,15
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]	55,45
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [K1C17_HUMAN]	29,75
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	116,46
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	276,85
Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens GN=KRT77 PE=2 SV=3 - [K2C1B_HUMAN]	36,09
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	200,82
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	69,68
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]	64,96
Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 - [K2C6B_HUMAN]	66,16
Keratin, type II cytoskeletal 74 OS=Homo sapiens GN=KRT74 PE=1 SV=2 - [K2C74_HUMAN]	18,48
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3 - [LPPRC_HUMAN]	23,10
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRRRC59 PE=1 SV=1 - [LRC59_HUMAN]	7,98

Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=LARS PE=1 SV=2 - [SYLC_HUMAN]	6,85
LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=LIMA1 PE=1 SV=1 - [LIMA1_HUMAN]	11,45
Liprin-beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPFIBP1 PE=1 SV=1 - [F5GZP6_HUMAN]	12,99
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]	24,55
L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]	51,99
Luc7-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=LUC7L3 PE=1 SV=2 - [LC7L3_HUMAN]	5,07
Lupus La protein OS=Homo sapiens GN=SSB PE=1 SV=2 - [LA_HUMAN]	23,54
Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3 - [SYK_HUMAN]	10,29
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]	9,11
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3 - [MDHM_HUMAN]	50,10
MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2 - [MRP_HUMAN]	4,30
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MARS PE=1 SV=2 - [SYMC_HUMAN]	4,55
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens GN=MA-PRE1 PE=1 SV=3 - [MARE1_HUMAN]	9,54
Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BUB3 PE=1 SV=1 - [J3QT28_HUMAN]	5,66
Multifunctional protein ADE2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=1 - [E9PBS1_HUMAN]	18,06
Myosin light chain 6B OS=Homo sapiens GN=MYL6B PE=1 SV=1 - [MYL6B_HUMAN]	17,14
Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1 - [F8W1R7_HUMAN]	39,66
Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=2 - [ML12A_HUMAN]	48,20
Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3 - [MYH10_HUMAN]	93,62
Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4 - [MYH9_HUMAN]	91,50
NADH-cytochrome b5 reductase 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYB5R3 PE=1 SV=1 - [B1AHF3_HUMAN]	5,53
N-alpha-acetyltransferase 50 OS=Homo sapiens GN=NAA50 PE=1 SV=1 - [C9J5J3_HUMAN]	3,95
Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=1 - [F5H6X6_HUMAN]	11,81
Neutral amino acid transporter B(0) OS=Homo sapiens GN=SLC1A5 PE=1 SV=2 - [AAAT_HUMAN]	5,05
Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1 - [NUDC_HUMAN]	5,57
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3 - [YBOX1_HUMAN]	18,88
Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 - [NUCL_HUMAN]	42,56
Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]	14,86
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=1 SV=1 - [H0YHC3_HUMAN]	11,16

Nucleosome assembly protein 1-like 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NAP1L4 PE=1 SV=1 - [E9PNW0_HUMAN]	4,30
Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=OLA1 PE=1 SV=2 - [OLA1_HUMAN]	7,70
Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OAT PE=1 SV=1 - [OAT_HUMAN]	14,26
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]	32,57
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 - [PPIB_HUMAN]	7,55
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1 - [FKBP3_HUMAN]	10,34
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3 - [FKBP4_HUMAN]	19,97
Peroxiredoxin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [A0A0A0M-SI0_HUMAN]	39,51
Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 - [PRDX2_HUMAN]	6,99
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]	72,19
Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]	11,88
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=1 SV=3 - [E7ER27_HUMAN]	8,99
PHD finger protein 6 OS=Homo sapiens GN=PHF6 PE=1 SV=1 - [Q5JRC6_HUMAN]	4,12
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=3 - [SYFB_HUMAN]	5,45
Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 PE=1 SV=1 - [F8VVM2_HUMAN]	4,92
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 - [PEBP1_HUMAN]	8,23
Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2 - [PGAM1_HUMAN]	8,94
POLDIP3 protein OS=Homo sapiens GN=POLDIP3 PE=1 SV=1 - [Q8WUT1_HUMAN]	5,03
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4 - [PARP1_HUMAN]	32,35
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (Inducible form), isoform CRA_e OS=Homo sapiens GN=PABPC4 PE=1 SV=1 - [B1ANR0_HUMAN]	10,52
Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MTPAP PE=1 SV=1 - [PAPD1_HUMAN]	11,07
Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 - [PCBP1_HUMAN]	9,74
Polyadenylate-binding protein OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=1 SV=1 - [A0A087WTT1_HUMAN]	9,99
Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PTBP1 PE=1 SV=4 - [A6NLN1_HUMAN]	20,47
Polyubiquitin-C (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBC PE=1 SV=1 - [F5H265_HUMAN]	15,57
POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=1 SV=3 - [POTEE_HUMAN]	73,50
Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens GN=PRPF19 PE=1 SV=1 - [PRP19_HUMAN]	4,16
Pre-mRNA-splicing regulator WTAP OS=Homo sapiens GN=WTAP PE=1 SV=2 - [FL2D_HUMAN]	5,89

Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 OS=Homo sapiens GN=DDX41 PE=1 SV=2 - [DDX41_HUMAN]	12,62
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens GN=DDX6 PE=1 SV=2 - [DDX6_HUMAN]	5,26
Probable serine carboxypeptidase CPVL OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=1 SV=2 - [CPVL_HUMAN]	8,25
Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]	20,29
Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens GN=PDCD6IP PE=1 SV=1 - [PDC6I_HUMAN]	5,04
Prohibitin OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1 - [PHB_HUMAN]	16,61
Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=1 - [F5GY37_HUMAN]	17,86
Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1 - [PCNA_HUMAN]	12,23
Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3 - [PA2G4_HUMAN]	19,22
Proteasome subunit alpha type OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1 - [G3V3U4_HUMAN]	5,34
Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=3 - [PSB5_HUMAN]	8,28
Proteasome subunit beta type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMB6 PE=1 SV=4 - [PSB6_HUMAN]	5,23
Protein ARPC4-TTLL3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARPC4-TTLL3 PE=1 SV=1 - [H7C0A3_HUMAN]	4,40
Protein deglycase DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=1 - [K7ELW0_HUMAN]	1,68
Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=1 - [H7BZJ3_HUMAN]	5,95
Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4 - [PDIA3_HUMAN]	7,61
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 - [PDIA1_HUMAN]	12,93
Protein LTV1 homolog OS=Homo sapiens GN=LTV1 PE=1 SV=1 - [LTV1_HUMAN]	13,29
Protein MB21D2 OS=Homo sapiens GN=MB21D2 PE=1 SV=3 - [M21D2_HUMAN]	5,43
Protein RCC2 OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=1 SV=2 - [RCC2_HUMAN]	9,00
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]	7,38
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=4 - [PIMT_HUMAN]	20,70
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2 - [DHX15_HUMAN]	3,57
Putative Ras-related protein Rab-1C OS=Homo sapiens GN=RAB1C PE=5 SV=2 - [RAB1C_HUMAN]	8,12
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 PE=1 SV=1 - [Q5JPU0_HUMAN]	4,40
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	53,71
Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2 - [GDIB_HUMAN]	19,74
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1 - [G3BP1_HUMAN]	10,93
Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens GN=RAB5C PE=1 SV=2 - [RAB5C_HUMAN]	4,54

Ras-related protein Rab-7a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 - [C9J592_HUMAN]	6,36
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDI1 PE=1 SV=1 - [J3KRE2_HUMAN]	6,25
Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens GN=RNH1 PE=1 SV=2 - [RINI_HUMAN]	12,26
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Homo sapiens GN=PRPS1 PE=1 SV=1 - [B1ALA9_HUMAN]	32,02
Ribosomal protein L19 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1 - [J3QL15_HUMAN]	6,66
RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=1 - [M0R0Y3_HUMAN]	5,73
Serine/arginine-rich-splicing factor 3 OS=Homo sapiens GN=SRSF3 PE=1 SV=1 - [A0A087X2D0_HUMAN]	4,77
Serine/threonine-protein phosphatase OS=Homo sapiens GN=PPP1CC PE=1 SV=1 - [F8VYE8_HUMAN]	16,11
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CA PE=1 SV=1 - [PP1A_HUMAN]	16,15
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CB PE=1 SV=3 - [PP1B_HUMAN]	15,39
Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Homo sapiens GN=STRAP PE=1 SV=1 - [STRAP_HUMAN]	12,93
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=SARS PE=1 SV=3 - [SYSC_HUMAN]	6,17
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]	40,17
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]	252,65
Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens GN=SF3B3 PE=1 SV=4 - [SF3B3_HUMAN]	5,04
Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 - [SFPQ_HUMAN]	29,50
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SND1 PE=1 SV=1 - [SND1_HUMAN]	5,89
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]	66,28
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SDHB PE=1 SV=3 - [SDHB_HUMAN]	4,98
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=1 SV=2 - [SBSN_HUMAN]	2,66
TAR DNA-binding protein 43 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TARDBP PE=1 SV=1 - [A0A087WX29_HUMAN]	4,83
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]	19,88
T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4 - [TCPB_HUMAN]	30,05
T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4 - [TCPD_HUMAN]	27,10
T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4 - [TCPG_HUMAN]	26,31
T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4 - [TCPQ_HUMAN]	38,87
T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3 - [TCPZ_HUMAN]	32,96

Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TARS PE=1 SV=3 - [SYTC_HUMAN]	5,67
Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=1 - [F2Z393_HUMAN]	3,44
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=TACC3 PE=1 SV=1 - [TACC3_HUMAN]	5,67
Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=1 - [X6RJP6_HUMAN]	21,66
Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]	24,72
Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=1 - [A0A0B4J1R6_HUMAN]	16,72
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]	10,70
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=GART PE=1 SV=1 - [PUR2_HUMAN]	23,01
Tropomodulin-3 OS=Homo sapiens GN=TMOD3 PE=1 SV=1 - [TMOD3_HUMAN]	20,49
Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=2 - [F5H7S3_HUMAN]	24,98
Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3 - [TPM4_HUMAN]	25,20
Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1 - [TBA1C_HUMAN]	78,10
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 - [TBB5_HUMAN]	118,90
Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 - [TBB2A_HUMAN]	95,27
Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 - [TBB4B_HUMAN]	108,15
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=YARS PE=1 SV=4 - [SYYC_HUMAN]	7,44
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=1 SV=1 - [D6RE83_HUMAN]	12,77
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=Homo sapiens GN=UBE2N PE=1 SV=1 - [UBE2N_HUMAN]	4,64
Unconventional myosin-IId OS=Homo sapiens GN=MYO1D PE=1 SV=2 - [MYO1D_HUMAN]	45,65
Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2 - [VPS35_HUMAN]	10,35
Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]	39,28
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2 - [VDAC1_HUMAN]	8,80
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE=1 SV=1 - [VDAC3_HUMAN]	5,07
X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3 - [XRCC5_HUMAN]	12,04
X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=1 - [B1AHC9_HUMAN]	9,85
Zinc finger protein 598 OS=Homo sapiens GN=ZNF598 PE=1 SV=1 - [H3BQQ2_HUMAN]	4,40

Anexo 8.3.3. Proteínas que interaccionan con TSC2 en las células tratadas con RESV

Description	Score
10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2 - [CH10_HUMAN]	4,86
14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4 - [1433F_HUMAN]	14,01
14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 - [1433G_HUMAN]	16,47
14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 - [1433T_HUMAN]	21,46
14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]	21,40
26S protease regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3 - [PRS7_HUMAN]	4,67
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSMD2 PE=1 SV=3 - [PSMD2_HUMAN]	9,59
40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1 - [RS10_HUMAN]	5,94
40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3 - [RS11_HUMAN]	7,25
40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3 - [RS12_HUMAN]	2,67
40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2 - [RS13_HUMAN]	16,39
40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3 - [RS14_HUMAN]	6,02
40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=1 - [I3L3P7_HUMAN]	5,90
40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=1 - [M0R210_HUMAN]	14,04
40S ribosomal protein S17-like OS=Homo sapiens GN=RPS17L PE=1 SV=1 - [RS17L_HUMAN]	10,72
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3 - [RS18_HUMAN]	23,16
40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2 - [RS19_HUMAN]	14,30
40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1 - [RS20_HUMAN]	6,08
40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1 - [RS25_HUMAN]	15,42
40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=1 SV=3 - [RS26_HUMAN]	5,47
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]	25,89
40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=1 - [D6RG13_HUMAN]	9,77
40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 - [RS4X_HUMAN]	21,16

40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1 - [M0R0F0_HUMAN]	15,70
40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=1 SV=1 - [A2A3R7_HUMAN]	4,74
40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 - [B5MCP9_HUMAN]	4,28
40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2 - [RS8_HUMAN]	22,84
40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3 - [RS9_HUMAN]	11,79
40S ribosomal protein SA (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4 - [C9J9K3_HUMAN]	18,07
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]	28,80
60S acidic ribosomal protein P0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 - [F8VS58_HUMAN]	8,28
60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1 - [RLA2_HUMAN]	9,89
60S ribosomal protein L13 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=1 - [J3QSB4_HUMAN]	5,10
60S ribosomal protein L17 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL17 PE=1 SV=3 - [J3KRB3_HUMAN]	4,39
60S ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=1 - [F8VUA6_HUMAN]	9,85
60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens GN=RPL18A PE=1 SV=1 - [M0R0P7_HUMAN]	9,44
60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1 - [RL23_HUMAN]	13,10
60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1 - [C9JXB8_HUMAN]	4,55
60S ribosomal protein L26 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL26 PE=4 SV=4 - [J3KTJ8_HUMAN]	6,42
60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2 - [RL27_HUMAN]	8,00
60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=1 - [E9P-JD9_HUMAN]	4,62
60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2 - [RL3_HUMAN]	7,69
60S ribosomal protein L30 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=1 - [E5RI99_HUMAN]	6,25
60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=1 - [F2Z388_HUMAN]	5,97
60S ribosomal protein L36a OS=Homo sapiens GN=RPL36A PE=1 SV=2 - [RL36A_HUMAN]	4,25
60S ribosomal protein L37a OS=Homo sapiens GN=RPL37A PE=1 SV=1 - [C9J4Z3_HUMAN]	3,75
60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens GN=RPL38 PE=1 SV=1 - [J3KT73_HUMAN]	3,96
60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5 - [RL4_HUMAN]	9,23

60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3 - [RL5_HUMAN]	14,03
60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 - [RL6_HUMAN]	15,37
60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1 - [A8MUD9_HUMAN]	5,47
60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2 - [RL7A_HUMAN]	18,86
60S ribosomal protein L8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=1 - [E9PKZ0_HUMAN]	5,24
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	54,80
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 - [ACTC_HUMAN]	55,99
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	117,74
Actin-related protein 10 OS=Homo sapiens GN=ACTR10 PE=1 SV=1 - [ARP10_HUMAN]	16,02
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_HUMAN]	3,79
ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	8,88
ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4 - [ADT3_HUMAN]	7,22
ADP-ribosylation factor 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARF4 PE=1 SV=1 - [C9JPM4_HUMAN]	4,60
Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=1 - [E9PCX2_HUMAN]	4,11
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 - [FETUA_HUMAN]	8,96
Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=1 - [H9KV75_HUMAN]	8,22
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 - [ACTN4_HUMAN]	23,76
Alpha-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1A PE=1 SV=1 - [ACTZ_HUMAN]	42,11
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]	57,09
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 OS=Homo sapiens GN=AIMP2 PE=1 SV=2 - [AIMP2_HUMAN]	5,22
Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2 - [ANXA2_HUMAN]	15,78
Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2 - [ANXA5_HUMAN]	8,75
Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA6 PE=1 SV=1 - [E5RK69_HUMAN]	8,00
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 - [APOA1_HUMAN]	21,95
Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=1 SV=3 - [AATM_HUMAN]	16,82
Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DARS2 PE=1 SV=1 - [SYDM_HUMAN]	5,61
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5F1 PE=1 SV=1 - [Q5QNZ2_HUMAN]	9,37
ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=1 - [H0YH81_HUMAN]	20,20
ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5O PE=1 SV=1 - [ATPO_HUMAN]	5,77

ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4 - [DHX9_HUMAN]	7,84
ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens GN=DDX39A PE=1 SV=2 - [DX39A_HUMAN]	9,17
Beta-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1B PE=1 SV=1 - [ACTY_HUMAN]	20,56
Bleomycin hydrolase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BLMH PE=1 SV=1 - [K7ES02_HUMAN]	5,75
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3 - [C1TC_HUMAN]	8,64
Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens GN=CACYBP PE=1 SV=2 - [CYBP_HUMAN]	12,65
Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2 - [CALX_HUMAN]	5,40
Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1 - [CALR_HUMAN]	15,18
Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=1 SV=1 - [B1AK87_HUMAN]	14,60
Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=1 SV=3 - [CBR1_HUMAN]	19,47
Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC42 PE=1 SV=2 - [CDC42_HUMAN]	5,73
Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 - [CLIC1_HUMAN]	13,91
Chromosome 6 open reading frame 55, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=V-TA1 PE=1 SV=1 - [A0A087WY55_HUMAN]	10,66
Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=1 - [G3V1A4_HUMAN]	10,21
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]	20,53
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1 - [C1QBP_HUMAN]	5,83
Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1 - [KCRB_HUMAN]	28,90
Cyclin-dependent kinase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CDK1 PE=1 SV=2 - [E5RIU6_HUMAN]	12,52
Cyclin-dependent kinase 2 OS=Homo sapiens GN=CDK2 PE=1 SV=1 - [E7ESI2_HUMAN]	7,23
Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]	2,99
Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]	4,90
Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=1 SV=2 - [CKAP4_HUMAN]	5,07
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]	24,07
D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDT PE=1 SV=3 - [DOPD_HUMAN]	7,53
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	6,03
DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens GN=MCM3 PE=1 SV=3 - [MCM3_HUMAN]	5,05
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DPM1 PE=1 SV=1 - [DPM1_HUMAN]	6,04
Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4 - [DREB_HUMAN]	9,45
Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=4 - [DCTN2_HUMAN]	42,15

Dynactin subunit 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DCTN3 PE=1 SV=1 - [X6RCK5_HUMAN]	11,52
Dynactin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DCTN4 PE=1 SV=1 - [DCTN4_HUMAN]	30,56
Dynactin subunit 6 OS=Homo sapiens GN=DCTN6 PE=1 SV=1 - [E5RFU3_HUMAN]	2,77
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens GN=TRIM21 PE=1 SV=1 - [RO52_HUMAN]	14,74
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=4 - [H0YL12_HUMAN]	6,26
Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Homo sapiens GN=ETFB PE=1 SV=3 - [ETFB_HUMAN]	4,34
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]	39,02
Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens GN=EEF1A2 PE=1 SV=1 - [EF1A2_HUMAN]	29,05
Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 - [EF1G_HUMAN]	16,35
Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 - [EF2_HUMAN]	32,63
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 - [EFTU_HUMAN]	15,16
Emerin OS=Homo sapiens GN=EMD PE=1 SV=1 - [Q5HY57_HUMAN]	2,34
Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=1 - [F8VY02_HUMAN]	4,97
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]	18,71
Epididymis luminal protein 189 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686J1372 PE=1 SV=1 - [Q5HYB6_HUMAN]	39,86
Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 - [J3KTB5_HUMAN]	18,54
Eukaryotic initiation factor 4A-III (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1 SV=1 - [I3L3H2_HUMAN]	8,86
Exosome complex exonuclease RRP44 OS=Homo sapiens GN=DIS3 PE=1 SV=1 - [F2Z2C0_HUMAN]	4,87
Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=3 - [E7EQR4_HUMAN]	6,13
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3 - [CAZA1_HUMAN]	29,26
F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=CAPZA2 PE=1 SV=3 - [CAZA2_HUMAN]	17,51
Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUBP1 PE=1 SV=3 - [FUBP1_HUMAN]	4,46
Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=1 - [A0A087WTP3_HUMAN]	7,03
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]	4,24
Four and a half LIM domains protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FHL1 PE=1 SV=1 - [Q5JXI8_HUMAN]	9,45
Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 - [ALDOA_HUMAN]	35,17
Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=2 - [K7EQ48_HUMAN]	8,46
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 OS=Homo sapiens GN=GFPT2 PE=1 SV=3 - [GFPT2_HUMAN]	12,89

Glutathione S-transferase Mu 3 OS=Homo sapiens GN=GSTM3 PE=1 SV=3 - [GSTM3_HUMAN]	5,00
Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]	10,80
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 - [G3P_HUMAN]	32,02
GRIP and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=GCC1 PE=1 SV=1 - [GCC1_HUMAN]	5,26
GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=3 - [RAN_HUMAN]	10,04
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha OS=Homo sapiens GN=GNAI3 PE=1 SV=3 - [GNAI3_HUMAN]	4,81
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=3 - [GBLP_HUMAN]	34,89
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 OS=Homo sapiens GN=GNB4 PE=1 SV=3 - [GBB4_HUMAN]	4,45
HCG2043239 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLV3-9 PE=1 SV=1 - [A0A-075B6K5_HUMAN]	6,03
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 - [HSP71_HUMAN]	120,40
Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4 - [HSP74_HUMAN]	21,22
Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=4 - [E9PK54_HUMAN]	46,68
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]	88,54
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]	5,23
Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 - [HS90A_HUMAN]	89,79
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]	71,12
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]	10,46
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=4 - [D6RF44_HUMAN]	11,13
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1 - [E9PCY7_HUMAN]	24,98
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens GN=HNRNPR PE=1 SV=1 - [B4DT28_HUMAN]	6,91
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_HUMAN]	4,55
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]	21,07
Histone H3 OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=1 SV=1 - [K7EMV3_HUMAN]	4,04
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]	14,80
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]	15,78
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=HPRT1 PE=1 SV=2 - [HPRT_HUMAN]	10,09
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]	12,48

Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [A0A087WYE1_HUMAN]	48,50
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]	37,43
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=1 - [A0A087WXL8_HUMAN]	47,76
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 - [A0A087X130_HUMAN]	39,98
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV302_HUMAN]	7,66
Ig lambda-2 chain C regions (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=4 SV=1 - [A0A075B6K9_HUMAN]	22,24
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3 - [IGHM_HUMAN]	5,02
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=1 SV=1 - [A0A087WYR4_HUMAN]	14,61
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=1 - [H0Y4R1_HUMAN]	9,74
Insulin receptor substrate 4 OS=Homo sapiens GN=IRS4 PE=1 SV=1 - [IRS4_HUMAN]	4,81
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2 - [IF2B1_HUMAN]	5,36
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=1 - [B4DY09_HUMAN]	20,02
Isoform 2 of 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Homo sapiens GN=EFTUD2 - [U5S1_HUMAN]	5,26
Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 - [PSMD1_HUMAN]	5,93
Isoform 2 of 60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 - [RL12_HUMAN]	11,35
Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD - [6PGD_HUMAN]	7,80
Isoform 2 of Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY - [SAHH_HUMAN]	11,92
Isoform 2 of Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 - [A1AT_HUMAN]	20,02
Isoform 2 of Angiotensin OS=Homo sapiens GN=AMOT - [AMOT_HUMAN]	13,40
Isoform 2 of Annexin A11 OS=Homo sapiens GN=ANXA11 - [ANX11_HUMAN]	2,51
Isoform 2 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 - [AIFM1_HUMAN]	9,26
Isoform 2 of Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=DARS - [SYDC_HUMAN]	7,78
Isoform 2 of ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 - [ATPA_HUMAN]	28,55
Isoform 2 of ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY - [ACLY_HUMAN]	6,15
Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X - [DDX3X_HUMAN]	14,02
Isoform 2 of Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens GN=ATIC - [PUR9_HUMAN]	13,01
Isoform 2 of Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A - [CO4A_HUMAN]	13,76
Isoform 2 of CTP synthase 1 OS=Homo sapiens GN=CTPS1 - [PYRG1_HUMAN]	7,32
Isoform 2 of Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN - [GELS_HUMAN]	7,06

Isoform 2 of Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Homo sapiens GN=GFPT1 - [GFPT1_HUMAN]	13,61
Isoform 2 of Glycogen phosphorylase, muscle form OS=Homo sapiens GN=PYGM - [PYGM_HUMAN]	4,22
Isoform 2 of Hamartin OS=Homo sapiens GN=TSC1 - [TSC1_HUMAN]	36,64
Isoform 2 of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP - [HPT_HUMAN]	36,07
Isoform 2 of Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 - [TRAP1_HUMAN]	11,20
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 - [ROA1_HUMAN]	13,25
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNRNPL - [HNRPL_HUMAN]	1,82
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM - [HNRPM_HUMAN]	10,32
Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 - [K2C78_HUMAN]	6,00
Isoform 2 of Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens GN=GLO1 - [LGUL_HUMAN]	6,49
Isoform 2 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRRFIP2 - [LRRF2_HUMAN]	5,78
Isoform 2 of Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=LARS - [SYLC_HUMAN]	8,82
Isoform 2 of Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 - [MDHC_HUMAN]	9,48
Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 OS=Homo sapiens GN=MAP3K5 - [M3K5_HUMAN]	8,33
Isoform 2 of Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 - [PGK1_HUMAN]	24,60
Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 - [DDX5_HUMAN]	13,65
Isoform 2 of Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 OS=Homo sapiens GN=XP-NPEP3 - [XPP3_HUMAN]	5,66
Isoform 2 of Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 - [PA2G4_HUMAN]	12,49
Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMA5 - [PSA5_HUMAN]	3,70
Isoform 2 of Protein flightless-1 homolog OS=Homo sapiens GN=FLII - [FLII_HUMAN]	6,55
Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 - [GDIB_HUMAN]	17,16
Isoform 2 of Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens GN=RAB1A - [RAB1A_HUMAN]	6,19
Isoform 2 of RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 - [RUVBL1_HUMAN]	13,64
Isoform 2 of S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 OS=Homo sapiens GN=MAT2A - [METK2_HUMAN]	5,09
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 - [TCPE_HUMAN]	13,66
Isoform 2 of Telomere-associated protein RIF1 OS=Homo sapiens GN=RIF1 - [RIF1_HUMAN]	16,70

Isoform 2 of Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXN-DC5 - [TXND5_HUMAN]	17,35
Isoform 2 of Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN - [THIO_HUMAN]	8,96
Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 - [PRDX3_HUMAN]	4,61
Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]	47,55
Isoform 2 of Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=WARS - [SYWC_HUMAN]	4,89
Isoform 2 of Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A - [TBA1A_HUMAN]	60,02
Isoform 2 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 OS=Homo sapiens GN=UBE2L3 - [UB2L3_HUMAN]	6,06
Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 - [UBA1_HUMAN]	41,98
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens GN=MYO1B - [MYO1B_HUMAN]	19,26
Isoform 2 of Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C - [MYO1C_HUMAN]	15,44
Isoform 3 of ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=ATAD3A - [ATD3A_HUMAN]	4,57
Isoform 3 of Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DCTN1 - [DCTN1_HUMAN]	91,35
Isoform 3 of Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L - [XPO2_HUMAN]	15,08
Isoform 3 of Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN - [GRN_HUMAN]	2,04
Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK - [HNRPK_HUMAN]	35,17
Isoform 3 of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 OS=Homo sapiens GN=MAP3K6 - [M3K6_HUMAN]	6,46
Isoform 3 of Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 - [NPM_HUMAN]	15,19
Isoform 3 of Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 - [PLST_HUMAN]	11,09
Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 - [PDIA6_HUMAN]	13,31
Isoform 3 of Protein enabled homolog OS=Homo sapiens GN=ENAH - [ENAH_HUMAN]	6,32
Isoform 3 of Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SHMT2 - [GLYM_HUMAN]	10,75
Isoform 3 of Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 - [STIP1_HUMAN]	8,11
Isoform 3 of TBC1 domain family member 7 OS=Homo sapiens GN=TBC1D7 - [TBCD7_HUMAN]	11,08
Isoform 4 of 60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens GN=RPL28 - [RL28_HUMAN]	4,41
Isoform 4 of Histone-binding protein RBBP4 OS=Homo sapiens GN=RBBP4 - [RBBP4_HUMAN]	5,23
Isoform 4 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H - [LKHA4_HUMAN]	9,04
Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 - [PAIRB_HUMAN]	14,24

Isoform 5 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP - [HNRPQ_HUMAN]	11,50
Isoform 7 of Tuberin OS=Homo sapiens GN=TSC2 - [TSC2_HUMAN]	14,77
Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 - [ROA2_HUMAN]	14,43
Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS - [SYRC_HUMAN]	5,91
Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB - [1433B_HUMAN]	14,77
Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU - [HNRPU_HUMAN]	11,49
Isoform Short of Protein C21orf2 OS=Homo sapiens GN=C21orf2 - [CU002_HUMAN]	10,04
Isoform SV of 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE - [1433E_HUMAN]	19,11
Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]	5,67
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	133,62
Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=1 - [K7E-RE3_HUMAN]	45,93
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	46,97
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]	45,61
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [F5GWP8_HUMAN]	26,99
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	106,19
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	246,87
Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens GN=KRT77 PE=2 SV=3 - [K2C1B_HUMAN]	30,47
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	165,62
Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4 - [K2C4_HUMAN]	9,73
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	71,36
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]	55,08
Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Homo sapiens GN=KRT73 PE=1 SV=1 - [K2C73_HUMAN]	27,00
Keratin, type II cytoskeletal 8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=1 - [F8VUG2_HUMAN]	17,39
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=L-RPPRC PE=1 SV=3 - [LPPRC_HUMAN]	12,84
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRRC59 PE=1 SV=1 - [LRC59_HUMAN]	5,21
LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=LIMA1 PE=1 SV=1 - [F8VRN8_HUMAN]	5,78

Liprin-beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPFIBP1 PE=1 SV=1 - [F5G-ZP6_HUMAN]	24,31
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]	24,34
L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]	37,85
Lupus La protein OS=Homo sapiens GN=SSB PE=1 SV=2 - [LA_HUMAN]	12,92
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]	8,14
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3 - [MDHM_HUMAN]	24,79
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MARS PE=1 SV=2 - [SYMC_HUMAN]	4,73
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens GN=MAPRE1 PE=1 SV=3 - [MARE1_HUMAN]	4,92
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15 OS=Homo sapiens GN=MAP3K15 PE=1 SV=2 - [M3K15_HUMAN]	4,63
Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BUB3 PE=1 SV=1 - [J3QT28_HUMAN]	8,32
Multifunctional protein ADE2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=1 - [E9PBS1_HUMAN]	9,11
Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1 - [F8W1R7_HUMAN]	27,97
Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=2 - [ML12A_HUMAN]	43,65
Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3 - [MYH10_HUMAN]	43,10
Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4 - [MYH9_HUMAN]	59,89
N-alpha-acetyltransferase 50 OS=Homo sapiens GN=NAA50 PE=1 SV=1 - [A0A087WWJ2_HUMAN]	4,88
Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=1 - [F5H6X6_HUMAN]	5,55
Neutral amino acid transporter B(0) OS=Homo sapiens GN=SLC1A5 PE=1 SV=2 - [AAAT_HUMAN]	6,81
Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1 - [NUDC_HUMAN]	6,38
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=1 - [A0A087X1S2_HUMAN]	11,68
Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 - [NUCL_HUMAN]	35,31
Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]	8,70
Nucleosome assembly protein 1-like 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NAP1L4 PE=1 SV=1 - [E9PNW0_HUMAN]	5,17
Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OAT PE=1 SV=1 - [OAT_HUMAN]	7,44
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]	19,37
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 - [PPIB_HUMAN]	5,00
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1 - [FKBP3_HUMAN]	6,00

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3 - [FKBP4_HUMAN]	22,64
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 OS=Homo sapiens GN=PPIL4 PE=1 SV=1 - [PPIL4_HUMAN]	8,11
Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]	43,65
Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 - [PRDX2_HUMAN]	14,72
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]	70,76
Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]	10,69
Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2 - [PGAM1_HUMAN]	8,16
Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 PE=1 SV=2 - [SERC_HUMAN]	15,68
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4 - [PARP1_HUMAN]	20,23
Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MTPAP PE=1 SV=1 - [PAPD1_HUMAN]	38,65
Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 - [PCBP1_HUMAN]	8,95
Poly(rC)-binding protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=1 SV=1 - [F8W0G4_HUMAN]	5,21
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PTBP1 PE=1 SV=1 - [K7EK45_HUMAN]	12,62
Polyubiquitin-B (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=1 SV=1 - [J3QSA3_HUMAN]	8,93
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 OS=Homo sapiens GN=DDX41 PE=1 SV=2 - [DDX41_HUMAN]	14,21
Probable serine carboxypeptidase CPVL OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=1 SV=2 - [CPVL_HUMAN]	6,97
Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]	12,35
Prohibitin OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1 - [PHB_HUMAN]	13,34
Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=1 - [F5GY37_HUMAN]	9,46
Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1 - [PCNA_HUMAN]	7,06
Proteasome activator complex subunit 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSME3 PE=1 SV=1 - [K7ENH2_HUMAN]	6,53
Proteasome subunit alpha type OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1 - [G3V3U4_HUMAN]	5,35
Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1 - [F5GX11_HUMAN]	4,88
Proteasome subunit beta type-5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=1 - [H0YJM8_HUMAN]	5,59
Protein disulfide-isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=1 - [I3L398_HUMAN]	4,61
Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4 - [PDIA3_HUMAN]	4,14
Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens GN=PDIA4 PE=1 SV=2 - [PDIA4_HUMAN]	5,79
Protein LTV1 homolog OS=Homo sapiens GN=LTV1 PE=1 SV=1 - [LTV1_HUMAN]	6,49
Protein MB21D2 OS=Homo sapiens GN=MB21D2 PE=1 SV=3 - [M21D2_HUMAN]	7,37

Protein RCC2 OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=1 SV=2 - [RCC2_HUMAN]	4,20
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]	5,10
Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]	4,38
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=4 - [PIMT_HUMAN]	17,04
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2 - [DHX15_HUMAN]	4,71
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	35,70
Radixin OS=Homo sapiens GN=RDX PE=1 SV=1 - [RADI_HUMAN]	6,33
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1 - [G3BP1_HUMAN]	13,19
Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 - [RAB7A_HUMAN]	6,89
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIA PE=1 SV=1 - [J3KRE2_HUMAN]	6,43
Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens GN=RNH1 PE=1 SV=2 - [RINI_HUMAN]	5,06
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Homo sapiens GN=PRPS1 PE=1 SV=2 - [PRPS1_HUMAN]	30,48
Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=1 - [E7EX53_HUMAN]	4,12
Ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1 - [J3QR09_HUMAN]	6,80
RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3 - [RUVB2_HUMAN]	10,53
Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPP1CB PE=1 SV=1 - [E7ETD8_HUMAN]	12,14
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4 - [2AAA_HUMAN]	7,76
Serine-threonine kinase receptor-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STRAP PE=1 SV=1 - [H0YH33_HUMAN]	6,48
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]	44,84
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]	226,68
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=1 SV=1 - [C9K0U8_HUMAN]	4,36
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 PE=1 SV=1 - [AT1A1_HUMAN]	8,45
Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 - [SFPQ_HUMAN]	15,21
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]	56,68
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]	14,72
T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=1 - [F8VQ14_HUMAN]	13,55
T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4 - [TCPD_HUMAN]	19,10
T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 PE=1 SV=2 - [TCPH_HUMAN]	27,11
T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4 - [TCPG_HUMAN]	18,22

T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4 - [TCPQ_HUMAN]	22,68
T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3 - [TCPZ_HUMAN]	11,36
Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=1 - [X6RJP6_HUMAN]	4,81
Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]	16,92
Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=1 - [A0A0B4J1R6_HUMAN]	16,13
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]	16,42
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=GART PE=1 SV=1 - [PUR2_HUMAN]	12,48
Tropomodulin-3 OS=Homo sapiens GN=TMOD3 PE=1 SV=1 - [TMOD3_HUMAN]	15,72
Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=2 - [F5H7S3_HUMAN]	17,47
Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1 - [J3KN67_HUMAN]	23,19
Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3 - [TPM4_HUMAN]	17,97
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 - [TBB5_HUMAN]	55,92
Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1 - [TBB2B_HUMAN]	38,35
Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 - [TBB4B_HUMAN]	38,97
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=YARS PE=1 SV=4 - [SYYC_HUMAN]	9,01
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=1 SV=1 - [D6R974_HUMAN]	6,17
Unconventional myosin-IId OS=Homo sapiens GN=MYO1D PE=1 SV=1 - [J3QRN6_HUMAN]	16,57
Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2 - [VPS35_HUMAN]	3,53
Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]	29,72
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1 - [VTDB_HUMAN]	14,05
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=1 SV=1 - [A0A0A0MR02_HUMAN]	5,10
X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3 - [XRCC5_HUMAN]	5,00
X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=2 - [XRCC6_HUMAN]	13,04

8.4 Anexo 4

Predicción de las lisinas de la proteína TSC2 susceptibles de desacetilación por la acción de SIRT1 mediante el uso del programa ASEB.

SIRT1	Protein	Site	Sequence	Votes
SIRT1	P49815	12	PTSKDSGLKEKFKILLG	9
SIRT1	P49815	14	SKDSGLKEKFKILLGLG	9
SIRT1	P49815	16	DSGLKEKFKILLGLGTP	9
SIRT1	P49815	34	PNPRSAEGKQTEFIITA	9
SIRT1	P49815	69	IGQICEVAKTKKFEEHA	9
SIRT1	P49815	71	QICEVAKTKKFEEHAVE	9
SIRT1	P49815	72	ICEVAKTKKFEEHAVEA	9
SIRT1	P49815	83	EHAVEALWKAVADLLQP	9
SIRT1	P49815	106	RHAVLALLKAIVQQQGE	8
SIRT1	P49815	125	GVLRALFFKVIKDYPSN	9
SIRT1	P49815	128	RALFFKVIKDYPSNEDL	9
SIRT1	P49815	144	LHERLEVFKALTDNGRH	9
SIRT1	P49815	185	LLVLVNLVKFNSCYLDE	9
SIRT1	P49815	250	TLCRTINVKELCEPCWK	9
SIRT1	P49815	258	KELCEPCWKLMRNLLGT	9
SIRT1	P49815	347	VLSITRLIKKYRKELQV	9
SIRT1	P49815	348	LSITRLIKKYRKELQVV	9
SIRT1	P49815	351	TRLIKKYRKELQVVAWD	9
SIRT1	P49815	438	RAQSIHPAKDGIQNLQ	9
SIRT1	P49815	464	ESRGAVRIKVLVLSFV	9
SIRT1	P49815	500	QLSHIPEDKDHQVRKLA	9
SIRT1	P49815	506	EDKDHQVRKLATQLLVD	9
SIRT1	P49815	533	NSLLDIIKVMARSLSP	9
SIRT1	P49815	561	YSASLEDVKTAVLGLLV	8
SIRT1	P49815	574	GLLVILQTKLYTLPASH	9
SIRT1	P49815	599	VSHIQLHYKHSYTLPIA	8
SIRT1	P49815	634	LHRLGLPNKDGVRVRFSP	6
SIRT1	P49815	657	MEPERGSEKKTSGPLSP	9
SIRT1	P49815	658	EPERGSEKKTSGPLSPP	9
SIRT1	P49815	698	FRVLLQCLKQESDWKVL	9
SIRT1	P49815	704	CLKQESDWKVLKVLGR	7
SIRT1	P49815	707	QESDWKVLKVLGRLPE	9
SIRT1	P49815	720	RLPESLRYKVLIFTSPC	8
SIRT1	P49815	745	LCSMLSGPKTLERLRGA	9
SIRT1	P49815	782	ISYHNYLDKTKQREMY	9
SIRT1	P49815	784	YHNYLDKTKQREMYCL	8
SIRT1	P49815	821	VEMPDIIKALPVLVVK	9

SIRT1	P49815	829	KALPVLVVKLTHISATA	9
SIRT1	P49815	880	SLPYTNPSKFNQYIVCL	9
SIRT1	P49815	906	IRCRLPFRKDFVPFITK	9
SIRT1	P49815	914	KDFVPFITKGLRSNVLL	9
SIRT1	P49815	930	LSFDDTPEKDSFRARST	8
SIRT1	P49815	945	STSLNERPKSLRIARPP	9
SIRT1	P49815	954	SLRIARPPKQGLNNSPP	9
SIRT1	P49815	964	GLNNSPPVKEFKESSAA	9
SIRT1	P49815	967	NSPPVKEFKESSAAEAF	9
SIRT1	P49815	1016	VAQADDSLKNLHLELTE	9
SIRT1	P49815	1043	FSNFTAVPKRSPVGEFL	9
SIRT1	P49815	1058	FLLAGGRTKTWLVGNKL	8
SIRT1	P49815	1065	TKTWLVGNKLVTVTTSV	9
SIRT1	P49815	1106	PGVHVRQTKEAPAKLES	9
SIRT1	P49815	1111	RQTKEAPAKLESQAGQQ	9
SIRT1	P49815	1165	GPRTAPAAKPEKASAGT	9
SIRT1	P49815	1168	TAPAAKPEKASAGTRVP	9
SIRT1	P49815	1180	GTRVPVQEKTNLAAYVP	9
SIRT1	P49815	1242	ALMAAERFKEHRDTALY	8
SIRT1	P49815	1251	EHRDTALYKSLSVPAAS	9
SIRT1	P49815	1262	SVPAASTAKPPPLPRSN	9
SIRT1	P49815	1345	SSVSSQEEKSLHAEELV	9
SIRT1	P49815	1384	FQPSQPLSKSSSSPELQ	8
SIRT1	P49815	1404	DILGDPGDKADVGRISP	9
SIRT1	P49815	1415	VGRLSPEVKARSQSGTL	9
SIRT1	P49815	1473	DSAPSRRGKRVERDALK	9
SIRT1	P49815	1481	KRVERDALKSRATASNA	9
SIRT1	P49815	1491	RATASNAEKVPGINPSF	9
SIRT1	P49815	1516	PFFGDESNKPILLPNES	8
SIRT1	P49815	1544	QIPSYDTHKIAVLYVGE	9
SIRT1	P49815	1585	GLGRILIELKDCQPDQVY	9
SIRT1	P49815	1591	ELKDCQPDQVYLGGLDV	9
SIRT1	P49815	1628	HIATLMPTKDVDKHRCD	9
SIRT1	P49815	1632	LMPTKDVDKHRCDKKRH	8
SIRT1	P49815	1637	DVDKHRCDKKRHLGNDF	9
SIRT1	P49815	1638	VDKHRCDKKRHLGNDFV	9
SIRT1	P49815	1658	YNDSGEDFKLGTIKGQF	9
SIRT1	P49815	1663	EDFKLGTIKGQFNFVHV	9
SIRT1	P49815	1689	NLVSLQCRKDMEGLVDT	9
SIRT1	P49815	1701	GLVDTSVAKIVSDRNLP	9
SIRT1	P49815	1739	NPTDIYPSKWIARLRHI	8
SIRT1	P49815	1748	WIARLRHIKRLRQRICE	7
SIRT1	P49815	1775	LVHPPSHSKAPAQTPAE	8

AGRADECIMIENTOS



Son muchas las personas a las que debo agradecer sinceramente el apoyo que me han dado para que esta tesis vea, al fin, la luz.

En primer lugar, dar las gracias a mis Directores de tesis, Carlos Guillén y Manuel Benito, dos excelentes investigadores y profesionales. A Carlos Guillén, por su constante dedicación, por ofrecerme siempre todo su apoyo, y por demostrarme que tiene una calidad humana excepcional. A Manuel Benito, por haber creído en mí, por el ánimo que me ha ofrecido, y por haberme enseñado muchos de los aspectos científicos que he aprendido.

Quisiera agradecer también a todo el personal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, por la ayuda que me habéis brindado desde que entré con la Beca de Colaboración. Especialmente a mis compañeros del Laboratorio 21, por tantos momentos divertidos, por haberme ayudado en los momentos más difíciles, y en definitiva, por su amistad. A Gema por su cariño y sus palabras, a Elena por su comprensión y escucharme siempre, a Silvia por conocerme tanto y por ser del atleti. Nunca olvidaré nuestras risas y nuestros karaokes. A Nuri, por ser tan buena y ser un ejemplo de gran trabajadora. A Dani, por su simpatía y su gran corazón. Como no, a Carlos de nuevo, por haberme enseñado a trabajar en un laboratorio, y por haber compartido también tantos buenos momentos. A Miriam, por haber estado a mi lado durante tanto tiempo, echándome una mano, siempre con una gran sonrisa, y por ser tan buena amiga y compañera. A Jesús, por haber estado conmigo este último tramo final y darme su apoyo. Sin olvidarme de Lily, a la que echamos mucho de menos. Gracias a todos, sin vosotros a mi lado, no lo hubiera conseguido. Muchas gracias a Óscar, Almudena, Sabela, Vanesa y Paola por tantos buenos consejos.

También quiero agradecer a Pilar Iniesta por su profesionalidad y ayuda, a Alberto Bartolomé por haberme enseñado los trucos y los protocolos durante los primeros experimentos, y gracias también a Elisa por su amabilidad. A María Areche y a Annalisa por su alegría y sus palabras de ánimo. A Víctor, Jackie, Tamara e Irene, por tantos cafés y comidas amenas.

Millones de gracias a mis amigos del instituto, de la universidad y del pueblo, por animarme y sacarme siempre una sonrisa: Eli, Isa, Julia, Yas, Marta, José, Pascu, David, Javi, Rome, Richi, Alba, Víctor, Marisa, Pili, Laura y Vega.

Pero sobre todo, gracias a mi familia, porque sois los que realmente me habéis dado todo vuestro apoyo y amor. En especial a mis abuelos, a mi tía Gema y a mi prima María, por estar siempre ahí. A mi hermano Alfonso por ser tan especial y porque me siento muy orgullosa de él. Pero si de verdad tengo que agradecer algo a alguien es a mis padres, Ana y Felipe, por haberme enseñado los valores más importantes de la vida, por apoyarme en todo, por darme energía y fuerzas, y ser la luz de mi camino. Si hoy soy lo que soy, es gracias a ellos.

Por último, gracias a Álvaro por estos años que han sido maravillosos a tu lado, por su amor, sus consejos, por acompañarme en este camino tan difícil, y por dar a esta tesis ese toque artístico tuyo tan único y especial.

Gracias a todos.

PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS



